

STRUKTURELLE MODIFIKATIONEN DER  
DNA-ABHÄNGIGEN RNA-POLYMERASE IN E. COLI  
NACH INFEKTION MIT DEM BAKTERIOPHAGEN T4

Reinhard Mailhammer

1976







Digitized by the Internet Archive  
in 2026

[https://archive.org/details/IA41554612\\_0016](https://archive.org/details/IA41554612_0016)

**STRUKTURELLE MODIFIKATIONEN DER  
DNA-ABHÄNGIGEN RNA-POLYMERASE IN E. COLI  
NACH INFEKTION MIT DEM BAKTERIOPHAGEN T4**

**Inaugural - Dissertation**  
zur Erlangung des Doktorgrades  
des Fachbereichs Biologie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München



**vorgelegt von**  
**Reinhard Mailhammer**  
aus Bad Wiessee

**München 1976**

STRUKTURELLE MODIFIKATIONEN DER  
DNA-ABHÄNGIGEN RNA-POLYMERASE IN E. COLI  
NACH INFektion MIT DER BAKTERIOPHAGEN T4

ausgeführt - Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
des Fachbereichs Biologie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München



vorgelegt von  
Reinhard Mehnert  
aus Bad Wiessee

1. Berichterstatter: Professor Dr. F. Kaudewitz  
2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. H. Schmieger

Tag der mündlichen Prüfung: 10. August 1976

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Professor Dr. W. Zillig am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, durchgeführt.

Herrn Professor Zillig danke ich sehr herzlich für die großzügige Förderung der Arbeit.

Der Max-Planck-Gesellschaft danke ich für ein Promotionsstipendium.



# INHALTSÜBERSICHT

|                                                                                                               | Seite |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Abkürzungsverzeichnis                                                                                         |       |
| A. EINLEITUNG                                                                                                 | 1     |
| B. ERGEBNISSE UND DISKUSSION                                                                                  | 3     |
| I. Strukturvergleich normaler, alterierter und<br>modifizierter RNA-Polymerase                                | 3     |
| 1. ( <sup>32</sup> P)-Phosphatmarkierung der RNA-Polymerasen                                                  | 3     |
| 2. Phosphatgehalt, Adeningehalt und elektrophore-<br>tisches Trennverhalten                                   | 6     |
| a) Normale RNA-Polymerase                                                                                     | 6     |
| b) Alterierte RNA-Polymerase                                                                                  | 8     |
| c) Modifizierte RNA-Polymerase                                                                                | 9     |
| 3. Vergleich alterierter und modifizierter<br>α-Untereinheiten                                                | 9     |
| 4. Versuche zur Abspaltung des modifizierenden<br>Restes                                                      | 10    |
| a) Ohne Isotopenmarkierung                                                                                    | 10    |
| b) Abspaltversuche an in vivo <sup>32</sup> P-markierter<br>modifizierter RNA-Polymerase                      | 12    |
| c) Abspaltversuche an in vivo <sup>32</sup> P-Phosphat-<br>markiertem α <sub>M</sub> und Analyse der Produkte | 14    |
| 5. Zusammenfassung von Kapitel I                                                                              | 18    |
| II. Mechanismen der Veränderungen der RNA-Polymerase                                                          | 19    |
| 1. Mechanismus der Alteration                                                                                 | 19    |
| a) Führen ungünstige Stoffwechselbedingungen<br>zur Alteration?                                               | 19    |
| b) Können Phagenbruchstücke alterieren?                                                                       | 20    |
| c) T4-ghost-Infektion und Alteration                                                                          | 20    |
| α) T4-ghost-Präparation                                                                                       | 21    |
| β) Biologische Aktivität der ghosts                                                                           | 21    |
| γ) ghost-Infektion führt nicht zur<br>Alteration                                                              | 24    |
| d) Löst Infektion mit UV-bestrahlten T4-Phagen<br>die Alteration aus?                                         | 24    |

|      |                                                                                                            |    |
|------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| e)   | Sind die bisher bekannten internen Kopfproteine an der Alteration beteiligt?                               | 28 |
| f)   | Freisetzung und Charakterisierung der Alterationstransferase aus T4 <sup>+</sup> -Phagen                   | 29 |
| g)   | Anmerkungen zur Nomenklatur                                                                                | 31 |
| 2.   | Mechanismus der Modifikation                                                                               | 32 |
| 3.   | Strukturvorschlag für die ADP-Ribosylierung von $\alpha$                                                   | 35 |
| 4.   | Zusammenfassung von Kapitel II                                                                             | 37 |
| III. | Biologischer Sinn von Alteration und Modifikation                                                          | 38 |
| 1.   | Einführung                                                                                                 | 38 |
| 2.   | Vergleich der Gesamt-RNA- und Proteinsynthese                                                              | 39 |
| 3.   | Modifikation der RNA-Polymerase als T4-induzierte negative Transkriptionskontrolle bakterieller Gene       | 43 |
| 4.   | Modifikation der RNA-Polymerase $\alpha$ -Untereinheit als negatives Kontrollelement der lac-Genexpression | 46 |
| 5.   | T4-DNA hemmt E.coli Genexpression in vitro                                                                 | 52 |
| 6.   | ADP-Ribosylierung und DNA-Kompetition als mögliche Mechanismen der Wirts-Genabschaltung                    | 54 |
| 7.   | Regulation der T4-Genexpression                                                                            | 57 |
| 8.   | Biologischer Sinn der Alteration                                                                           | 59 |
| 9.   | Alteration und Modifikation unter der Kontrolle nicht essentieller Phagengene                              | 60 |
| 10.  | Zusammenfassung von Kapitel III                                                                            | 61 |
| C.   | MATERIAL UND METHODEN                                                                                      | 63 |
| I.   | Material                                                                                                   | 63 |
| 1.   | Substanzen                                                                                                 | 63 |
| 2.   | Bakterienmedien                                                                                            | 63 |

|                                                                   | Seite |
|-------------------------------------------------------------------|-------|
| 3. Puffer und andere Lösungen                                     | 64    |
| 4. Organismen                                                     | 66    |
| II. Methoden                                                      | 66    |
| 1. Analytische Methoden                                           | 66    |
| a) Test der RNA-Synthese                                          | 66    |
| b) Elektrophoretische Trennmethode                                | 67    |
| c) Bakterienlyse und Immunpräzipitation                           | 67    |
| d) Radioaktivitätsbestimmung von Banden aus<br>Polyacrylamidgelen | 68    |
| e) Phosphatbestimmung                                             | 68    |
| f) POISSON-Verteilung                                             | 69    |
| 2. Präparative Methoden                                           | 70    |
| a) Phagentechniken                                                | 70    |
| α) Gewinnung von phageninfizierten<br>Bakterien                   | 70    |
| β) Herstellung von T4-Lysaten                                     | 70    |
| γ) Herstellung von T4-Konzentraten                                | 70    |
| δ) Reinigung von T4-Phagen                                        | 71    |
| ε) Präparation von Ø80 und λ Phagen                               | 71    |
| ζ) UV-Inaktivierung von Phagen                                    | 71    |
| η) Präparation von Phagen-ghosts                                  | 71    |
| θ) Präparation von Phagenbausteinen                               | 72    |
| b) Darstellung von DNA                                            | 73    |
| c) Isolierung der RNA-Polymerase                                  | 73    |
| α) Normalmethode                                                  | 73    |
| β) Schnellmethode                                                 | 74    |
| d) Zusammensetzung des zellfreien Proteinsyn-<br>thesesystems     | 74    |
| D. ZUSAMMENFASSUNG                                                | 76    |
| Literaturverzeichnis                                              | 78    |
| Lebenslauf                                                        |       |

# ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

|                                |                                                                      |
|--------------------------------|----------------------------------------------------------------------|
| DNA = DNS                      | Desoxyribonukleinsäure                                               |
| T4-DNA                         | Desoxyribonukleinsäure des Bakteriophagen T4                         |
| RNA = RNS                      | Ribonukleinsäure                                                     |
| mRNA                           | messenger-RNA (Boten-RNA)                                            |
| tRNA                           | Aminotransfer-RNA (sRNA, lösliche RNA)                               |
| rRNA                           | ribosomale-RNA                                                       |
| ATP, CTP, GTP, UTP             | Ribonukleosid-5'-triphosphate von Adenin, Cytosin, Guanin, Uracil    |
| XDP                            | Ribonukleosiddiphosphate                                             |
| XMP                            | Ribonukleosidmonophosphate                                           |
| E <sub>N</sub>                 | normale DNA-abhängige RNA-Polymerase (E.C. 2.7.7.6)                  |
| E <sub>A</sub>                 | alterierte DNA-abhängige RNA-Polymerase                              |
| E <sub>M</sub>                 | modifizierte DNA-abhängige RNA-Polymerase                            |
| $\alpha_N, \alpha_A, \alpha_M$ | normale, alterierte und modifizierte $\alpha$ -Untereinheit          |
| Minimalenzym                   | E <sub>N</sub> ohne Initiationsfaktor $\sigma$                       |
| Transferase                    | NAD <sup>+</sup> :Protein ADP-Ribosyltransferase (E.C. 2.7.8.-)      |
| ghost                          | Phagenhülle ohne DNA                                                 |
| moi                            | multiplicity of infection (Zahlenverhältnis von Phagen zu Bakterien) |
| DNAse                          | Desoxyribonuklease                                                   |
| RNAse                          | Ribonuklease                                                         |
| CAM                            | Chloramphenicol                                                      |
| cAMP                           | Adenosin-3':5'-monophosphorsäure, cyclisch                           |
| Ci                             | Curie                                                                |
| cpm                            | gemessene Impulse pro Minute                                         |
| DEAE-Cellulose                 | Diäthylaminoäthyl-Cellulose                                          |
| EDTA                           | Äthylendiaminetetraessigsäure                                        |
| M                              | Molarität                                                            |
| OAc                            | Acetatrest                                                           |
| OD                             | optische Dichte                                                      |
| P <sub>i</sub>                 | anorganisches Phosphat                                               |
| PC                             | Phosphorylcellulose                                                  |
| Rib-P                          | Ribose-5-Phosphat                                                    |

|      |                                                                        |
|------|------------------------------------------------------------------------|
| Rif  | Rifampicin                                                             |
| S-30 | 30.000 g Überstand; DNA-abhängiges zell-<br>freies Proteinsynthesystem |
| SDS  | Natriumdodecylsulfat                                                   |
| TCA  | Trichloressigsäure                                                     |
| Tris | Trishydroxymethylaminomethan                                           |
| ADPR | Adenosindiphosphoribose                                                |



## A. EINLEITUNG

Nach weitgehendem Abschluß der beschreibend-vergleichenden Phase in der Entwicklung der Naturwissenschaften stehen heute experimentell-analysierende Arbeitsweisen im Vordergrund.

Von zentralem Interesse in den biologischen Wissenschaften sind hierbei Kontroll- und Regelungsvorgänge auf allen Ebenen, angefangen von Interaktionen zwischen und innerhalb von Populationen über Steuerungsvorgänge in Organismen, Organen und Zellen bis zur Aktivitätskontrolle einzelner Makromoleküle.

Der Verkleinerung der Größenordnungen folgt auch eine Verringerung des Zeitbedarfs, von vielen Jahren bis zu Bruchteilen von Millisekunden. Jeder dieser Vorgänge ist direkt oder indirekt von der in allen Organismen ablaufenden selektiven Expression der genetischen Information abhängig.

Von den Produkten der ca. 4 500 Gene einer Zelle des Bakteriums *Escherichia coli* wird zum Beispiel in einem bestimmten physiologischen Zustand nur ein Teil benötigt. Obwohl *E.coli* im Ablauf der Generationen die Produkte aller Gene braucht, besteht zu jedem Einzelzeitpunkt das Problem des Informationsüberflusses. Die zeitlich und mengenmäßig richtig gesteuerte Ausprägung bestimmter Gene setzt Mechanismen voraus, die sowohl eine zeitliche als auch qualitative und schließlich eine quantitative Kontrolle der Genexpression erlauben.

Durch die Arbeiten der Bakteriengenetik wurden die wichtigsten Grundzüge dieser Kontrolle bekannt. Das An- und Abschalten einzelner Gene oder Gengruppen - Vorgänge, die im Minutenbereich liegen - erwies sich größtenteils als Regulation der Transkription (Überschreiben der DNA in eine RNA-Kopie durch das Enzym RNA-Polymerase) und weniger der Translation (der Synthese von Proteinen durch Ribosomen an einer mRNA).

Hierbei wurden vor allem Mechanismen bekannt, die auf einem Abdecken oder Verstärken von Signalstellen der DNA durch Bindung von

Repressoren oder Aktivatoren an diese beruhen.

In den letzten Jahren hat sich der Schwerpunkt der Untersuchungen auf die Regulationsvorgänge in der Virus-infizierten Bakterienzelle verlagert. Diese irreversiblen Steuerungen in Richtung auf optimale Virusproduktion - in manchen Fällen erfolgt schon nach 20 Minuten die Freisetzung der Virusnachkommen - können als Modell für Differenzierung dienen. Die Übersichtlichkeit dieser gegenüber anderen relativ einfach zu analysierenden Modelle beruht darauf, daß die Regulation von wenigen Genprodukten aufzuklären ist. Je nach Genomgröße sind dies bei kleinen Phagen nicht mehr als 10, ca. 30 beim Bakteriophagen T7 bis zu maximal ca. 120 beim Bakteriophagen T4. Bei diesen Untersuchungen wurden prinzipiell neue Mechanismen der Transkriptionskontrolle entdeckt. Einer von diesen, der auf struktureller Modifikation der Wirts-RNA-Polymerase beruht und in der T4-infizierten E.coli-Zelle verwirklicht ist, wird in dieser Arbeit vorgestellt.

Die Veränderungen der Wirts-RNA-Polymerase laufen in zwei Stufen ab:

Die erste, genannt Alteration, erfolgt unmittelbar nach Infektion durch den Bakteriophagen T4, auch bei gehemmter Proteinsynthese.

Die zweite, genannt Modifikation, wird durch ein erst in der infizierten Zelle synthetisiertes T4-Genprodukt hervorgerufen. Sie läuft daher langsamer und nur in Gegenwart von Proteinsynthese ab. Da der Phage T4 für sein gesamtes Transkriptions-Programm das Grundgerüst dieser veränderten Wirts-RNA-Polymerase benutzt, gewinnen diese beiden Veränderungen an Bedeutung.

Im Laufe der Untersuchungen wurde klar, daß es sich hierbei jeweils um ADP-Ribosylierungen handelt, die bisher einzigen bei Bakterien bekannten überhaupt.

## B. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

### I. Strukturvergleich normaler, alterierter und modifizierter RNA-Polymerase

Durch Walter und Seifert aus unserer Arbeitsgruppe war gefunden worden, daß nach T4-Infektion sowohl unter Alterations- als auch Modifikationsbedingungen (s. Material und Methoden) die  $\alpha$ -Untereinheit der E.coli RNA-Polymerase einen Zuwachs an negativer Ladung erfährt (1, 2). Goff und Weber konnten zeigen, daß die modifizierte  $\alpha$ -Untereinheit Phosphat enthält, und sich aus ihr 5'-AMP abspalten läßt (3). Dies war der Erkenntnisstand zu Beginn meiner Untersuchungen der Alteration und Modifikation. Als Voraussetzung zur Ermittlung der Natur der angehefteten Reste wurde von mir daher zunächst der Phosphat- und Adeningehalt alterierter und modifizierter RNA-Polymerase untersucht (s. I,1-4).

Es ergab sich, daß sowohl  $\alpha_A$  als auch  $\alpha_M$  je zwei Phosphate wie auch einen Adeninrest trägt. Damit war die Ansicht, daß die Modifikation auf einer Anheftung von AMP beruht (3) widerlegt. Um nun zwischen der von uns postulierten Anheftung eines ADP-Ribose-restes oder der alternativen Möglichkeit der Bindung eines ADP-Restes entscheiden zu können, wurden enzymatische Versuche zur Abspaltung des Restes unternommen (s. I,6).

Geleitet von unseren stöchiometrischen Angaben gelang es Goff, aus T4-infizierten Zellen ein in vitro System zu entwickeln, das unter Verbrauch von  $\text{NAD}^{\oplus}$  ADP-Ribosereste in die  $\alpha$ -Untereinheit der RNA-Polymerase einbaut (4).

#### 1. ( $^{32}\text{P}$ )-Phosphatmarkierung der RNA-Polymerasen

Zunächst wurde die Menge des Einbaus von radioaktivem Phosphat in die RNA-Polymerase gemessen. Sowohl unter Modifikations- als auch Alterationsbedingungen wurde zur ( $^{32}\text{P}$ )-Phosphatmarkierung der E.coli RNA-Polymerase ein phosphatarmes Medium mit einem Phosphatgehalt von 0.2 mM benutzt (s. Material und Methoden).

Bei einer Generationszeit von 70 min bewirkte die Zugabe von ( $^{32}\text{P}$ )-Phosphat 10-15 min vor Phageninfektion maximalen Einbau in die Untereinheiten der RNA-Polymerase. So wurde ein hoher Markierungsgrad der relativ niedermolekularen phosphathaltigen Verbindungen, und damit auch des Alterations- und Modifikations-substrates, sichergestellt. Diese Beobachtung machte auch Horvitz (5). Ein "Verdünnen" der Markierung in DNA und stabile RNA wurde dadurch vermieden.

Zugabe von ( $^{32}\text{P}$ )-Phosphat unmittelbar nach dem Animpfen oder wenigstens 5 Generationen vor Phageninfektion bewirkte eine gleichmäßige Markierung aller Phosphatverbindungen der Zelle. Dieses Verfahren ermöglichte über die Bestimmung der spezifischen Aktivität des gesamten Zellphosphates Aussagen zur Stöchiometrie des angehefteten Restes.

Um die Menge des in normale, T4 alterierte und in T4 modifizierte E.coli RNA-Polymerase eingebauten Phosphates bestimmen zu können, wurden die Bakterien nach dem letzteren Verfahren markiert und wie in Tab. 1 angegeben gezogen.

| RNA-Polymerase-<br>Typ | Bedingungen                               |                              |                     |
|------------------------|-------------------------------------------|------------------------------|---------------------|
|                        | Zugabe bei<br>0 min                       | Phageninfektion<br>bei 3 min | Erntezeit-<br>punkt |
| NORMAL                 | -                                         | -                            | 0 min               |
| ALTERIERT              | 10 µg/ml Trypto-<br>phan<br>100 µg/ml CAM | T4 amN82, moi 5              | 9 min               |
| MODIFIZIERT            | 10 µg/ml Trypto-<br>phan                  | T4 amN82, moi 5              | 11 min              |

Tab. 1    Phosphateinbau in RNA-Polymerase

Die Zucht von E.coli B erfolgte in 2 l Ansätzen in phosphat-armem Medium (0.2 mM Phosphat) bei 37°C unter starkem Belüften. Bereits bei einer Zelldichte von  $1 \times 10^7$ /ml wurden 25 mCi ( $^{32}\text{P}$ )-Phosphat (100 Ci/mg Phosphor) zugegeben. Bei  $5 \times 10^8$  Zellen/ml erfolgte Infektion mit T4-Phagen, die gegen phosphatfreies Medium dialysiert waren. Unmittelbar vor der Bakterienernte durch Zentrifugation wurden die Ansätze auf 0.01 M  $\text{NaN}_3$  gebracht und mit Eis gekühlt.

Als Voraussetzung exakter Angaben der Stöchiometrie des Phosphat-einbaus in die RNA-Polymerase waren zur Ermittlung der spezifischen Radioaktivität im Medium sowohl quantitative Bestimmungen der Phosphatmenge als auch deren Radioaktivität nötig.

Vor der Bakterienernte wurde Medium entnommen, hydrolysiert und dann dessen Phosphatgehalt kolorimetrisch gemessen (s. Material und Methoden). Die zusätzliche Radioaktivitätsbestimmung dieser Proben in Bray-Lösung erlaubte die Berechnung der spezifischen Aktivität des Phosphats. Aus den geernteten Bakterien (jeweils ca. 2 g) wurden nach einer Schnellmethode (6) die RNA-Polymerasen in mehr als 95 %iger Reinheit isoliert. Nach Messung des  $^{32}\text{P}$ -Gehalts der verschiedenen Polymerase-Präparationen und Bestimmungen der Proteinkonzentrationen der Polymeraselösungen mittels einer Mikromethode (7) ließ sich dann der Phosphatgehalt von normaler, alterierter und modifizierter RNA-Polymerase berechnen (s. Tab. 2).

| Enzym                 | cpm/ $\mu\text{g}$ Polymerase | spezif. Aktivität des<br>( $^{32}\text{P}$ )-Phosphats im<br>Medium<br>cpm/ $\mu\text{M}$ Phosphat | Molverhältnis<br>Phosphat / Poly-<br>merase |
|-----------------------|-------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|
| $\text{E}_{\text{N}}$ | 58                            | $7.5 \times 10^7$                                                                                  | 0.38                                        |
| $\text{E}_{\text{A}}$ | 286<br>308                    | "<br>"                                                                                             | 1.86<br>2.00                                |
| $\text{E}_{\text{M}}$ | 563<br>582                    | "<br>"                                                                                             | 3.66<br>3.78                                |

Tab. 2    Phosphatgehalt von normaler, T4-alterierter und  
T4-modifizierter RNA-Polymerase

## 2. Phosphatgehalt, Adeningehalt und elektrophoretisches Trennverhalten

### a) Normale RNA-Polymerase

Phosphat in RNA-Polymerase aus uninfizierten E.coli-Zellen kann bis heute nur reproduzierbar nachgewiesen werden, wenn die Zellen in phosphatarmem Medium wachsen. Sowohl im selbst entwickelten (s. Material und Methoden) als auch in einem anderen Medium (8) kommt es zur Bindung von Phosphat an die  $\alpha$ -Untereinheiten der RNA-Polymerase (9). Der Phosphateinbau (sowohl Puls- als auch Dauermarkierung) lässt sich erst gegen Ende der logarithmischen Wachstumsphase feststellen. Im Vergleich zur T4-induzierten Alteration oder Modifikation der RNA-Polymerase ist diese Phosphatmarkierung wenig untersucht. Wie Autoradiogramme von SDS-Polyacrylamid-Gelen zeigen, wird ausschließlich die RNA-Polymerase  $\alpha$ -Untereinheit durch Phosphat markiert (10). Allerdings wird bei Inkubation mit 15  $\mu\text{g/ml}$  an RNase und DNase bei 4°C über Nacht die gesamte Markierung entfernt, so daß eine Bindung von Oligonukleotiden nicht ausgeschlossen werden kann (11).

Der quantitative Umfang dieser Phosphorylierung lässt sich anhand der Daten aus Tab. 2 ansehen. Mit ca. 0.4 Molen Phosphat je Mol RNA-Polymerase können maximal 40 % der RNA-Polymerase Moleküle betroffen sein. Falls beide  $\alpha$ -Untereinheiten eines Enzyms betroffen wären, oder es sich um die Anheftung von Resten mit mehr als einem Phosphat handelte, könnte dieser Maximalwert noch beträchtlich absinken.

Wie in Abb. 1,C dargestellt, spaltet normale RNA-Polymerase ( $E_N = \beta'\alpha_{N2}\sigma$ ) mit einem Molekulargewicht von 487.000 in einem SDS Polyacrylamid-Gel in die einzelnen Polypeptidketten auf. Die Wanderungsgeschwindigkeit im Gel nimmt mit sinkendem Molekulargewicht der Untereinheiten zu ( $\beta' = 160.000$ ,  $\beta = 155.000$ ,  $\sigma = 92.000$ ,  $\alpha_N = 40.000$ ).

Im Gegensatz dazu erfolgt die analytische oder präparative Auftrennung von  $E_N$  auf Celluloseacetatstreifen (Abb. 1,A) in 6 M Harnstoff nach der Ladungsdichte. So zeigt z.B. die saure

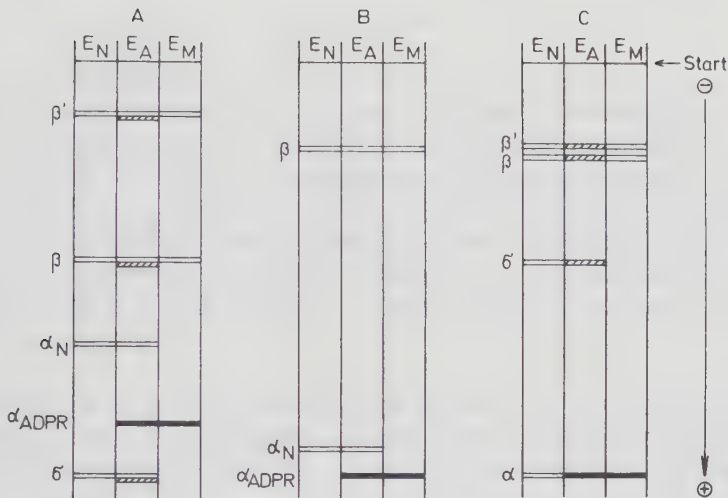


Abb. 1 Schematische Darstellung der elektrophoretischen Auftrennung von normaler ( $E_N$ ), T4-alterierter ( $E_A$ ) und T4-modifizierter ( $E_M$ ) RNA-Polymerase

Die Auftrennung erfolgte auf Celluloseacetatgel (A) in Gegenwart von 6 M Harnstoff in Boratpuffer bei pH 8.9.

Die Trennung im Harnstoff-Polyacrylamidgel (B) wurde bei pH 8.8 in 8 M Harnstoff durchgeführt. Die Trennung nach Molekulargewicht erfolgte im SDS-Polyacrylamid-Gradientengel (C). Zellen aus ( $^{32}\text{P}$ )-phosphathaltigem Medium zeigen schwachen (hatched) bis starken (solid black) Einbau von ( $^{32}\text{P}$ )-Phosphat in die angegebenen Untereinheiten. Die genauen Arbeitsbedingungen sind unter Material und Methoden angegeben.

$\alpha_{\text{ADPR}}$  = ADP-ribosyliertes  $\alpha$ .

$\beta$ -Untereinheit trotz ihres größeren Molekulargewichts eine höhere anodische Beweglichkeit als  $\alpha_N$ .

#### b) Alterierte RNA-Polymerase

Bei T4-Infektion von E.coli in Gegenwart von Chloramphenicol werden ca. 2 Phosphate je Molekül RNA-Polymerase eingebaut (Tab. 2). Abb. 1,A läßt erkennen, daß alle Untereinheiten alterierter RNA-Polymerase phosphoryliert vorliegen: Allerdings erfolgt der überwiegende Einbau in die  $\alpha$ -Untereinheit (12, 13, 5, 14). Der Anteil alterierter  $\alpha$ -Untereinheiten geht niemals über 50 % hinaus. Der Einbau von 2 Phosphatresten und deren Konzentrierung auf die Hälfte der  $\alpha$ -Untereinheiten zeigt, daß  $\alpha_A$  2 Phosphatreste trägt.

Auf Grund des Zuwachses an negativer Ladung hat  $\alpha_A$  eine größere anodische Beweglichkeit und erscheint daher z.B. in der Elektrophorese auf Cellogel (Abb. 1,A) und in harnstoffhaltigen Polyacrylamidgelen (Abb. 1,B) als definierte Bande von  $\alpha_N$  getrennt (12, 14).  $\alpha_A$  läuft in diesen Systemen genau gleich wie das später zu behandelnde  $\alpha_M$ .

Da der Phosphorylierungsgrad gering ist, sind auf Cellogel vor  $\beta'$ ,  $\beta$  und  $\sigma$  bei Anfärbung auf Protein keine Banden sichtbar. Im Autodiagramm liegt die Phosphatmarkierung aber jeweils gegenüber der Hauptproteinmenge in Richtung Anode verschoben vor (Abb. 1,A) (12, 14).

Die Messung des Differenzspektrums zwischen gleich konzentrierter  $\alpha_A$  und  $\alpha_N$ -Lösung bei neutralem pH zeigte ein Maximum bei 260 nm. Das Extinktionsverhältnis, z.B.  $E_{260}/E_{280}$  glich dem von Adenylsäure. Unter der Annahme gleicher molarer Extinktion von gebundenem Adenosin und freier Adenylsäure errechneten sich 0.97 Adeninreste je  $\alpha_A$  Peptidkette.

Die gesamten analytischen Daten ergeben, daß  $\alpha_A$  gegenüber  $\alpha_N$  zusätzlich 2 Phosphate und ein Adenin in kovalenter Bindung

trägt. Wie später gezeigt wird, handelt es sich um einen ADP-Ribose-Rest, welcher aus  $\text{NAD}^{\oplus}$  unter Abspaltung von Nicotinsäureamid von einem injizierten Phagenenzym übertragen wird.

### c) Modifizierte RNA-Polymerase

Bei T4-Infektion von E.coli unter Proteinsynthesebedingungen erfolgt maximaler Phosphateinbau in die RNA-Polymerase. Tab. 2 gibt an, daß 3.7 bis 3.8 Phosphatreste je RNA-Polymerase eingebaut werden. Da es sich bei der Modifikation auch um eine ADP-Ribosylierung handelt, sind im Molverhältnis Phosphat:RNA-Polymerase nur ganzzahlige Werte zu erwarten. Der gerundete Wert von 4 Phosphatresten je modifizierter RNA-Polymerase stimmt mit allen Analysedaten überein.

Die Modifikation erfolgt praktisch vollständig. Da modifizierte RNA-Polymerase das eingebaute Phosphat ausschließlich in den beiden  $\alpha$ -Untereinheiten zeigt (Abb. 1), liegen 2 Phosphate je  $\alpha$ -Peptidkette vor.

Bei Auftrennung in der Cellogel-Elektrophorese nach Ladungsdichte (Abb. 1,A) läuft  $\alpha_M$  - in identischer Position wie  $\alpha_A$  - mit gegenüber  $\alpha_N$  erhöhter anodischer Beweglichkeit. Da die ADP-Ribosylierung der  $\alpha$ -Untereinheiten die Affinität der RNA-Polymerase zur  $\sigma$ -Untereinheit vermindert, kann je nach Aufarbeitungsbedingungen in  $E_M$  die  $\sigma$ -Untereinheit sogar völlig fehlen (1, 2). Die  $\sigma$ -Untereinheit ist aber in modifizierten Zellen noch vorhanden, und nur deren Bindung an modifiziertes Minimalenzym ist herabgesetzt (RNA-Polymerase ohne  $\sigma$ -Untereinheit = Minimalenzym). Durch Zugabe von normalem Minimalenzym zu aufgeschlossenen modifizierten Zellen bindet  $\sigma$  an dieses und läßt sich mit der RNA-Polymerase reinigen (13).

Auch in  $\alpha$ -Untereinheiten aus modifizierter RNA-Polymerase ließ sich ebenso wie bei  $\alpha_A$  ein Adeninrest (gemessen 0.89) je  $\alpha_M$  Peptidkette nachweisen. (12, 13). Goff fand 0.8 Adeninreste je  $\alpha_M$  (4).

### 3. Vergleich alterierter und modifizierter $\alpha$ -Untereinheiten

Die Untersuchungen zur Stöchiometrie zeigen, daß  $\alpha_A$  und  $\alpha_M$  je

Peptidkette sowohl zwei Phosphate (s. Tab. 2) als auch einen Adeninrest tragen. Daher kann weder Alteration noch Modifikation durch kovalente Bindung von AMP-Resten erklärt werden. Die Anheftung von ADP-Ribose- oder ADP-Resten wird wahrscheinlich.

Volle Gleichheit von  $(^{32}\text{P})\alpha_A$  und  $(^{32}\text{P})\alpha_M$  zeigt sich auch bei Analyse deren tryptischer Spaltprodukte (9, 15). Trotz unterschiedlicher Entstehungsweise erweist sich also  $\alpha_A$  als identisch mit  $\alpha_M$ .

#### 4. Versuche zur Abspaltung des modifizierenden Restes

Um entscheiden zu können, ob die strukturelle Modifikation der RNA-Polymerase auf einer ADP-Ribosylierung oder der Anheftung eines ADP-Restes beruht, wurden mit verschiedenen hydrolytischen Enzymen Abspaltversuche unternommen.

##### a) Ohne Isotopenmarkierung

Experimente zur Umwandlung von  $\alpha_M$  oder  $\alpha_A$  in phosphatfreies  $\alpha$  mittels einer Phosphodiesterase-Präparation aus Schlangengift (Tab. 3,d) mit relativ hohem Phosphomonoesterasegehalt waren wegen offensichtlich zu geringer Pyrophosphataseaktivität nicht erfolgreich. Durch Behandlung isolierter  $\alpha$ -Untereinheiten war es nicht möglich, ihr Wanderungsverhalten in der Cello-gel-Elektrophorese (Abb. 1,A) zu beeinflussen:  $\alpha_M$  wie auch  $\alpha_A$  wanderten unverändert schneller als  $\alpha_N$ .

Daß Phosphodi- und Phosphomonoesteraseaktivität nicht genügt, den durch Alteration oder Modifikation gebundenen Rest abzuspalten, steht in vollem Einklang mit der Analyse seiner chemischen Natur. ADP-Ribose-Reste sind durch diese Enzymkombination nicht spaltbar.

Gewählte Bedingungen: 0.05 M Tris/HCl, pH 8.9, 0.5 mM  $\text{CaCl}_2$ , 5 M Harnstoff, 20  $\mu\text{g}$   $\alpha$  und 1  $\mu\text{g}$  Phosphodiesterase (Tab. 3,d; dialysiert gegen 0.01 M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , pH 8.5, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ ). Gesamtvolumen 20  $\mu\text{l}$ . Nach 30 min Inkubation bei 37°C wurde der Ansatz auf 0.01 M Dithiothreitol gebracht, 30 min gegen 1:10 verdünnten Boratpuffer dialysiert und anschließend auf Cello-gel analysiert. Zahl der Versuche:  $\alpha_M$  3 x,  $\alpha_A$  1 x,  $\alpha_N$  1 x. Dasselbe Ergebnis ergab sich in Abwesenheit von Harnstoff.

| Enzyme <sup>1)</sup>                                                                              | Volumen<br>µl | PNPT <sup>2)</sup><br>0.5mM | PNP <sup>3)</sup><br>2mM | OD <sub>405</sub>  |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|-----------------------------|--------------------------|--------------------|
| a) Phosphodiesterase <sup>4)</sup> aus<br>Crotalus adamanteus,<br>Worthington VPH OCA,<br>1 mg/ml | 10<br>"<br>"  | +<br>-<br>-                 | -<br>+<br>+              | >9<br>0.01<br>0.16 |
| b) Schlangengift Phospho-<br>diesterase<br>Worthington VPH 107<br>1 mg/ml                         | "<br>"        | +<br>-                      | -<br>+                   | >9<br>0.16         |
| c) Pyrophosphatase <sup>5)</sup> aus<br>Crotalus adamanteus,<br>Sigma<br>1 mg/ml                  | "             | +                           | -                        | >9                 |
| d) Schlangengift Phospho-<br>diesterase <sup>6)</sup><br>Boehringer<br>1 mg/ml                    | "<br>"        | +<br>-                      | -<br>+                   | >9<br>4.8          |
| e) alkal. Phosphomono-<br>esterase<br>Worthington BAPC<br>1 mg/ml                                 | "<br>"        | +<br>-                      | -<br>+                   | 0.01<br>>9         |
| f) Proteinase K,<br>Merck<br>0.3 mg/ml                                                            | 100<br>"      | +<br>-                      | -<br>+                   | 0.002<br>0.001     |

Tab. 3     Charakterisierung der Hydrolyseenzyme

10 bis 100 µl Enzym wurden in einem Gesamtvolumen von 2 ml in 0.05 M Tris/HCl, pH 8.0, 0.5 mM CaCl<sub>2</sub> mit Substrat 12 h bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml NaOH Messung der Extinktion bei 405 nm.

- 1) Enzyme gelöst in 0.01 M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>
- 2) 2'-Desoxy-thymidin-5'-p-nitrophenylphosphat als Phosphodiesterasesubstrat
- 3) p-Nitrophenylphosphat als Phosphomonoesterase-substrat
- 4) Geschenk von Kédinger, Straßburg; hat starke pyrophosphorolytische Aktivität.
- 5) Wegen begleitender Proteaseaktivität nicht weiter verwendet.
- 6) Test bei 25°C ergab 54 mE/µl Enzymlösung. Präinkubation u. Test unter 5 M Harnstoff stört nicht (50 mE/ µl Enzym-lösung). 0.01 M Dithiothreitol hemmt die Phosphodiesterase-aktivität.

Weitere Abspaltversuche an  $^{32}\text{P}$ -markierter modifizierter RNA-Polymerase wurden mit anderen Phosphodiesterase-Präparationen durchgeführt (s. nächster Abschnitt, 4 b)).

Des weiteren zeigte sich, daß durch Inkubation von  $\text{E}_\text{N}$  oder  $\text{E}_\text{M}$  in 80 % Ameisensäure (15 h,  $4^\circ\text{C}$ ) oder 80 % Essigsäure (5 min,  $100^\circ\text{C}$ ) keine Änderung von  $\alpha_\text{N}$  oder  $\alpha_\text{M}$  erfolgte (Analyse im Harnstoff-Polyacrylamidgel, Abb. 1, B). Der ADP-Riboserest bleibt also auch unter diesen Bedingungen an die  $\alpha$ -Polypeptidkette gebunden.

b) Abspaltversuche an in vivo  $^{32}\text{P}$ -markierter modifizierter RNA-Polymerase.

Unter Modifikationsbedingungen tragen im Gegensatz zur Alteration alle  $\alpha$ -Untereinheiten Phosphatmarkierung, und da diese auf die  $\alpha$ -Ketten beschränkt ist, wurde für die folgenden Abspaltversuche in vivo ( $^{32}\text{P}$ )-Phosphat-markiertes  $\text{E}_\text{M}$  verwendet.

Durch Phosphodiesterase aus Schlangengift mit Nukleotid-pyrophosphorolytischer Aktivität (Tab. 3, a) läßt sich aus  $\text{E}_\text{M}$  50 % der Radioaktivität abspalten (Tab. 4). Die Eigenschaften der verwendeten Enzyme werden aus den Tab. 3 und 5 deutlich. Die folgenden Versuche sind in Tab. 4 dokumentiert.

Nachfolgende Behandlung mit Phosphomonoesterase kann auch die restliche Markierung noch ausbauen. Angriff durch Phosphomonoesterase allein hat keinen Effekt. Dieses Verhalten und auch die Analyse der Reaktionsprodukte (s. Tab. 5) sind im Einklang mit der Annahme, daß es sich bei der Modifikation um eine ADP-Ribosylierung handelt.

Der erfolglose Einsatz von  $\text{NAD}^\oplus$ -Glycohydrolasen, Enzymen, welche  $\beta\text{-NAD}^\oplus$  in Nicotinamid und ADP-Ribose spalten, kann an deren Spezifität liegen.

Die teilweise Überführung der Markierung in TCA lösliche, filterbare Form durch Protease-Hydrolyse schließt aus, daß es sich

|                                                                | TCA fällbare<br>Radioaktivität<br>nach Inkubation<br>in % | Zahl der<br>Bestimmungen |
|----------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|--------------------------|
| Kontrollinkubation <sup>1)</sup>                               | 100 <sup>2)</sup>                                         | 4                        |
| <u>Enzymatische Hydrolyse:</u> <sup>3)</sup>                   |                                                           |                          |
| Phosphodiesterase <sup>4)</sup>                                | 51.7                                                      | 6                        |
| Phosphomonoesterase <sup>5)</sup>                              | 98                                                        | 3                        |
| 1. Phosphodiesterase,<br>2. Phosphomonoesterase<br>(je 60 min) | 0.3                                                       | 1                        |
| NAD <sup>+</sup> -Glycohydrolase <sup>6)</sup> aus             |                                                           |                          |
| Neurospora crassa                                              | 100                                                       | 1                        |
| Schweinehirn                                                   | 115                                                       | 1                        |
| Kälbermilz                                                     | 115                                                       | 1                        |
| Proteinase K <sup>7)</sup>                                     | 18                                                        | 1                        |
| Pronase <sup>7)</sup>                                          | 29                                                        | 1                        |
| <u>Chemische Hydrolyse:</u> <sup>8)</sup>                      |                                                           |                          |
| 0.3 M KOH 7 min 0°C                                            | 83                                                        | 1                        |
| 0.3 M KOH 7 " 70°C                                             | 23.5                                                      | 2                        |
| 0.3 M KOH 7 " 100°C                                            | 8                                                         | 2                        |
| 0.3 M HCl 7 " 70°C                                             | 81                                                        | 2                        |
| 1 M HCl 7 " 100°C                                              | 12.5                                                      | 2                        |

Tab. 4 Freisetzung von Radioaktivität aus (<sup>32</sup>P) Phosphat-markiertem  
E<sub>M</sub>

- 10 µl (<sup>32</sup>P)<sub>E<sub>M</sub></sub> (1 mg/ml) wurden zu 0.2 ml 0.05 M Tris/HCl, pH 8.0, gegeben; nach Inkubation (60 min, 37°C) Zugabe von 0.1 ml Rinderserum Albumin (2 mg/ml); dann Fällung mit 0.3 ml 10 % TCA für 10 min bei 0°C. Anschließend Filtration des Präzipitats.
- 100 % = 2830 Impulse/20 min. Zählerwert abgezogen.
- 10 µl Enzym (1 mg/ml 0.1 M Tris/HCl, pH 8.0, 0.05 M CaCl<sub>2</sub>) zum Inkubationsansatz.
- Nur Präparationen von Phosphodiesterase mit pyrophosphorolytischer Aktivität aus Schlangengift wurden verwendet (s. Tab. 3,a).
- Alkalische Phosphomonoesterase aus E.coli (s. Tab. 3,e).
- Diese NAD-Glycohydrolasen (Sigma) lagen als unlösliches Pulver vor.
- Zur Proteasehydrolyse war die Inkubation auch 5 mM an CaCl<sub>2</sub>. Gesamtinkubationsdauer 4 h. Nach den ersten 2 h wurden erneut 0.01 ml Protease zugegeben. Pronase war Nuclease-frei.
- Zur chemischen Hydrolyse wurde 0.01 ml E<sub>M</sub> in 0.2 ml Lauge bzw. Säure inkubiert. Albuminzugabe und Fällung wie bei Kontrollinkubation.

bei der Modifikation um Anheftung von Polynukleotiden oder um Poly-ADP-Ribosylierung handelt.

Die Versuche zur chemischen Hydrolyse zeigen deutlich die starke Labilität des Restes bzw. seiner Bindung an die  $\alpha$ -Untereinheit sowohl im alkalischen als auch im sauren Bereich. Die Hydrolysegeschwindigkeit bei 70°C ist in KOH aber ca. dreimal höher als in HCl. Auch Goff hat für in vivo modifizierte RNA-Polymerase diese Labilität gezeigt (3, 4). Dasselbe Hydrolyseverhalten zeigt auch in vitro alterierte RNA-Polymerase (14). Bei den folgenden Experimenten wurden auch die abgespaltenen Verbindungen analysiert.

c) Abspaltversuche an in vivo ( $^{32}\text{P}$ )-Phosphat-markiertem  $\alpha_{\text{M}}$  und Analyse der Produkte

Hierzu wurde  $^{32}\text{P}$ -markiertes  $\text{E}_{\text{M}}$  auf Celluloseacetat-Streifen elektrophoretisch in seine Untereinheiten aufgetrennt. Nach ihrer Lokalisierung wurde die Untereinheit  $\alpha_{\text{M}}$  aus dem entsprechenden Abschnitt herauszentrifugiert und die erhaltene Lösung gegen den verwendeten Inkubationspuffer dialysiert.

Hydrolyseversuche dieses ( $^{32}\text{P}$ ) $\alpha_{\text{M}}$ 's erfolgten mit den in Tab. 3 charakterisierten Enzymen. Zur elektrophoretischen Auftrennung auf Papier oder Cellulosedünnschichtplatten wurde der gesamte Inkubationsansatz oder ein Aliquot aufgetragen. Der Nachweis der Spaltprodukte erfolgte, wie in Tab. 5 jeweils angegeben, durch Autoradiographie, Sprühreagens auf reduzierende Zucker, oder durch Beobachtung der vom Adenin stammenden Fluoreszenzlöschung bei UV-Bestrahlung. Die relativen elektrophoretischen Beweglichkeiten der zur Identifizierung jeweils mitlaufenden Referenzsubstanzen sind in Tab. 6 angegeben.

Die an ( $^{32}\text{P}$ )  $\alpha_{\text{M}}$  gewonnenen Ergebnisse (Tab. 5) stehen in vollem Einklang mit den an ( $^{32}\text{P}$ ) $\text{E}_{\text{M}}$  gewonnenen (Tab. 4). Kurzzeitiges Kochen des Materials setzt den modifizierenden Rest nicht frei. (Tab. 5,a). Allerdings zeigte eine Charge  $\alpha_{\text{M}}$ , welche versehentlich 48 Stunden nicht eingefroren sondern bei 4°C im Kühlschrank aufbe-

# BEDINGUNGEN

# NACHWEIS

| Zeit<br>(min) | Temp.<br>(°C) | Lösungs-<br>mittel | Substrat und Enzyme <sup>2)</sup> | Start-<br>region                                              | 5'-AMP        | ADP-<br>Ribose | Rib-P <sub>i</sub> | Nachweisart                                         | Papier-<br>elektro-<br>phorese | Platten-<br>elektro-<br>phorese | Zahl der<br>Versuche |
|---------------|---------------|--------------------|-----------------------------------|---------------------------------------------------------------|---------------|----------------|--------------------|-----------------------------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|----------------------|
| a             | 7             | 100                | A                                 | 15 µl (32P)q, 3)                                              | -             | -              | -                  | Autoradiogramm <sup>4)</sup>                        | x                              | -                               | 1                    |
| b             | 15            | 37                 | B                                 | "                                                             | 100 %         | -              | -                  | "                                                   | x                              | -                               | 1                    |
| c             | 15            | 37                 | B                                 | "                                                             | >95 %         | -              | -                  | "                                                   | x                              | -                               | 1                    |
| d             | 15            | 37                 | B                                 | "                                                             | ~40 %<br>+ 6) | <5 %           | -                  | "                                                   | x                              | -                               | 2                    |
| e             | 15            | 37                 | B                                 | "                                                             | "             | ~50 %          | <5 %               | "                                                   | x                              | -                               | 4                    |
| f             | 60            | 37                 | B                                 | 10 "                                                          | +             | -              | -                  | "                                                   | -                              | x                               | 1                    |
| g             | 90            | 37                 | B                                 | 15 "                                                          | 30 %          | -              | -                  | "                                                   | x                              | -                               | 2                    |
| h             | 15            | 37                 | B                                 | 10 "                                                          | <10 %         | -              | -                  | "                                                   | -                              | x                               | 2                    |
| i             | 45            | 37                 | B                                 | 10 "                                                          | 100 %         | -              | -                  | "                                                   | -                              | x                               | 1                    |
| j             | 60            | 37                 | B                                 | 10 "                                                          | >95 %         | -              | -                  | "                                                   | -                              | x                               | 1                    |
| k             | 60            | 37                 | B                                 | 15 "                                                          | <5 %          | -              | -                  | "                                                   | x                              | -                               | 1                    |
| l             | 5-60          | 37                 | B                                 | 175 µl ADP-Ribose Lsg. (10 mg/ml) und 10 µl Phosphodiesterase | -             | +              | +                  | Sprühreagens <sup>8)</sup><br>plus UV <sup>9)</sup> | -                              | x                               | 6                    |
| m             | 120           | 37                 | B                                 | 20 µl 5'-AMP Lsg. (4 mg/ml) + 20 µl Phosphodiesterase         | -             | + 10)          | -                  | UV                                                  | -                              | x                               | 1                    |
| n             | 7             | 100                | C                                 | je 50 µl ADP-Ribose (5 mg/ml)                                 | -             | -              | -                  | Sprühreagens + UV                                   | -                              | x                               | 4                    |

Tab. 5 Absaltversuche an (32P)-markiertem  $\alpha_2$

- 1) A = H<sub>2</sub>O; B = 0.03 M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, pH 7.8; C = 0.01 bis 0.5 M HCl
- 2) Enzyme gelöst in 0.03 M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, pH 7.8, 2 mM CaCl<sub>2</sub>; 1 mg/ml
- 3) In vivo (32P)-Phosphat-markiert, 1 mg/ml
- 4) Autoradiogramme ca. 1 Woche belichtet. Prozentuale Verteilung nach visuellem Eindruck geschätzt.

5) aus Schlangengift, s. Tab. 3,a

6) Wegen geringer Dauer der Autoradiographie waren schwache Flecken nur schwer erkennbar. Daher keine quantitative Angabe in %-Werten.

7) aus E.-coli, s. Tab. 3,e.

8) s. Material und Methoden

9) Fluoreszenzbildung bei UV-Bestrahlung beobachtet.

10) eine Spur von Adenosin war sichtbar.

wahrt wurde, deutlich freie ADP-Ribose (Tab. 5,c).

Die verwendete Schlangengift-Phosphodiesterase-Präparation spaltet ADP-Ribose in AMP und Rib-P (Tab. 5,1). Ebenso wurde die in der erwähnten  $\alpha_M$ -Lösung enthaltene ADP-Ribose gespalten. Wie Tab. 5,d zeigt, ist dies der einzige Ansatz mit  $\alpha_M$ , welcher zu einer geringen Freisetzung von Ribose-Phosphat führt. Die benutzte Phosphodiesterase-Präparation kann die Hälfte der  $^{32}\text{P}$ -Markierung abspalten (Tab. 4). Dies zeigen auch die Experimente in Tab. 5,d und e: Jeweils 50 % der Markierung des  $\alpha_M$ 's sind abspaltbar und als 5'-AMP nachzuweisen. Die andere Hälfte ist noch am Protein gebunden und bleibt daher wie dieses in der Elektrophorese am Start liegen.

Die Freisetzung von AMP in dieser Menge ist neben der Stöchiometrie (2 Phosphate /  $\alpha_M$ ) und der Säurelöslichkeit des Restes nach Proteasebehandlung ein Beweis, daß es sich bei der Modifikation um keine Oligo- oder Poly-ADP-Ribosylierung handelt.

Vervielfachte Mengen an Phosphodiesterase und gleichzeitige vier- bis sechsfache Inkubationszeiten machen die sonst kaum nachweisbare (Tab. 3, Tab. 5,m) Phosphomonoesteraseaktivität in der Phosphodiesterasepräparation sichtbar. Sowohl das  $^{32}\text{P}$  aus dem 5'-AMP als auch aus der am Protein verbliebenen anderen Spalthälfte erscheint als anorganisches Phosphat (Tab. 5,f und g).

Wie bei  $E_M$  vermag Phosphomonoesterase allein auch bei  $\alpha_M$  keine Spaltung am Rest zu bewirken (Tab. 5,h und i). Zusammen mit der Diesterase überführt sie allerdings die gesamte Markierung in  $P_i$  (Tab. 5,j und k).

ADP-Ribose ist in 0.5 M HCl, für 7 min bei 100°C stabil (Tab. 5,n). Andererseits zeigt Tab. 4, daß in 1 M HCl (7 min, 100°C) ein starker Ausbau der Markierung aus  $(^{32}\text{P})E_M$  erfolgt. Es besteht also die Möglichkeit, daß unter diesen Bedingungen der intakte ADP-Ribose-Rest freigesetzt wird. Leider gelang es nicht, das mit Säure abgespaltene Material elektrophoretisch aufzutrennen. Poly-ADP-Ribose wird in 1 M HCl (7 min, 100°C) vollständig

zu säurelöslichem Material hydrolysiert (16). Die Hydrolyseprodukte wurden aber nicht identifiziert, und es ist durchaus möglich, daß hier die Pyrophosphatbindung wie auch in 0.5 M HCl intakt bleibt.

|            | Cellulose-Dünnschicht-Platten | Zahl der Bestimmungen | Papier           | Zahl der Bestimmungen |
|------------|-------------------------------|-----------------------|------------------|-----------------------|
| $P_i$      | 1.0<br>(= 9.5 cm)             | 4                     | 1.0<br>(= 26 cm) | 6                     |
| 5'-AMP     | 0.10                          | 4                     | 0.19             | 7                     |
| 3'-AMP     | 0.19                          | 2                     |                  |                       |
| ADP-Ribose | 0.21                          | 4                     | 0.46             | 6                     |
| ADP        | 0.26                          | 2                     |                  |                       |
| Rib-P      | 0.68                          | 4                     | 0.70             | 8                     |
| Adenosin   | -0.63                         | 1                     |                  |                       |

Tab. 6    Analytische Auftrennung in der Hochspannungselektrophorese

Die relativen elektrophoretischen Beweglichkeiten in 0.05 M  $NH_4OAc$ , pH 3.2, sind angegeben.

Trennbedingungen auf Celluloseplatten: 2 KV, 30-40 mA

60 min Elektrophorese bei 3°C

Papierelektrophorese: 5 KV, 100 mA

40 min Elektrophorese bei 3°C

## 5. Zusammenfassung von Kapitel I

T4-Infektion führt in einem schnellen, Proteinsynthese-unabhängigen Schritt zur Alteration der RNA-Polymerase von E.coli. Ist Proteinsynthese möglich, folgt darauf in einer langsameren Reaktion deren Modifikation. Von der Alteration ist nur die Hälfte der beiden  $\alpha$ -Untereinheiten, von der Modifikation sind beide betroffen.  $\alpha_A$  und  $\alpha_M$  zeigen Zuwachs an negativer Ladung und wandern bei Auftrennung nach Ladungsdichte in identischen, von  $\alpha_N$  verschiedenen Positionen. Sowohl  $\alpha_A$  als auch  $\alpha_M$  tragen einen Adeninrest und zwei Phosphate je Peptidkette. Durch Schlangengift Phosphodiesterase läßt sich aus  $\alpha_M$  5'-AMP abspalten. Der zweite Phosphatrest bleibt am Protein, ist aber jetzt für Phosphomonoesterase zugänglich. Phosphomonoesterase allein vermag nichts abzuspalten. Dieses Verhalten würde man bei der Anheftung eines ADP-Ribose- aber auch eines ADP-Restes erwarten. Die Entscheidung für einen ADP-Ribosylrest in  $\alpha_M$  ist möglich, weil es in einem Fall gelang, ADP-Ribose als Hydrolyseprodukt nachzuweisen. Unabhängig davon wurde gezeigt, daß  $\alpha_A$  ADP-ribosyliertes  $\alpha$  darstellt (14). Da auch die zweidimensionale Auftrennung der tryptischen Peptide von ( $^{32}\text{P}$ )  $\alpha_A$  und ( $^{32}\text{P}$ )  $\alpha_M$  eine identische Verteilung der unmarkierten und der  $^{32}\text{P}$ -markierten Peptide liefert, sind  $\alpha_A$  und  $\alpha_M$  als chemisch identisch anzusehen (9). Daher muß auch  $\alpha_M$  ADP-ribosyliertes  $\alpha$  sein.

Durch zwei verschiedene Mechanismen erfolgen also nach T4-Infektion strukturelle Veränderungen der Wirts-RNA-Polymerase, die zu chemisch gleicher ADP-ribosylierter  $\alpha$ -Untereinheit führen.

## II. Mechanismen der Veränderungen der RNA-Polymerase

### 1. Mechanismus der Alteration

Das Charakteristikum der Alteration der Wirts-RNA-Polymerase ist, daß sie nach T4-Infektion rasch abläuft und dazu keine Proteinsynthese nötig ist. Es spielt dabei keine Rolle, ob die Proteinsynthese direkt durch Chloramphenicol blockiert wird (2) oder mit Rifampicin die Transkription von Phagen- oder Wirtsgenen verhindert wird (Abb. 6) (5).

Für die Alteration kommen daher nur drei mögliche Ursachen in Frage:

- Da  $\alpha_A$  und  $\alpha_M$  chemisch identisch sind, der  $\alpha_A$  Anteil aber nie über 50 % der gesamten  $\alpha$ -Menge hinaus geht, könnte die Alteration eine unvollständige Modifikation sein. Die unvollständig gehemmte Synthese eines T4 DNA codierten Genproduktes muß ausgeschlossen werden.
- Bei der Alteration handelt es sich um eine latente Wirtskapazität, die durch Phageninfektion nur ausgelöst wird.
- Die Alterationstransferase wird vom Phagen bei der Infektion in den Wirt injiziert.

Um entscheiden zu können, ob Phagenproteine für die Alteration verantwortlich sind, oder ob Alteration die Auslösung einer latenten Wirtskapazität durch den Phagen bedeutet, wurden folgende Versuche durchgeführt:

#### a) Führen ungünstige Stoffwechselbedingungen zur Alteration?

E.coli B wurde in Medium A 5 min vor der Ernte auf 100  $\mu\text{g/ml}$  CAM oder 0.01 M  $\text{NaN}_3$  gebracht. Eine andere Kultur wurde erst geerntet, nachdem die Bakterien für mindestens eine Stunde im stationären Zustand der Wachstumskurve waren. Nach Aufarbeitung ergab sich in allen drei Fällen in der Cellogelelektrophorese RNA-Polymerase mit unveränderten  $\alpha$ -Unterein-

heiten. Damit ist ausgeschlossen, daß die bei der Ernte von Bakterien mit alterierter Polymerase auftretenden Bedingungen von sich aus das Alterationsphänomen auslösen können.

b) Können Phagenbruchstücke alterieren?

Die Morphogenese des Phagen T4 läuft über drei Hauptwege, nämlich die Synthese

- der mit DNA gefüllten Köpfe,
- der Schwänze
- und der Schwanzfasern.

Diese Strukturelemente treten dann in definierter Reihenfolge zu intakten Phagen zusammen (17).

Für jeden dieser drei Teilwege stehen T4am Mutanten zur Verfügung. Durch Infektion eines nicht permissiven E.coli-Stammes mit diesen Mutanten sammeln sich in den infizierten Bakterien die jeweils vollständig synthetisierten, aber nicht zum Zusammenbau verwendeten Phagenteile an. Durch Aufschluß dieser Bakterien lassen sich Extrakte mit hoher Konzentration dieser Phagenbausteine herstellen (18) (s. Material und Methoden). Behandlung von E.coli B mit Phagenschwänzen, Schwanzfasern oder Phagenköpfen führte aber weder zu einem Rückgang des Bakterientiters noch zur Alteration der RNA-Polymerase.

Um zu erkennen, ob die Alteration eventuell auf der Penetration der Bakterienmembranen oder der Zellwand beim Infektionsprozeß beruht, wurden die Bakterien im folgenden Versuch mit Phagen-ghosts behandelt. Ghosts sind Phagen, welche durch osmotischen Schock ihre DNA verloren haben.

c) T4-ghost-Infektion und Alteration

Hierzu mußte zuerst  $\alpha$ ) die optimale Methode der ghost-Präparation gefunden werden. Dazu mußte  $\beta$ ) deren Fähigkeit, Bakterien abzutöten, gemessen werden. Schließlich wurde  $\gamma$ )

versucht, mit einer ghost-Präparation bei E.coli die Alteration der RNA-Polymerase auszulösen.

α) T4-ghost-Präparation.

Verschiedene in der Literatur angegebene Methoden wurden zur ghost-Präparation verwendet (19,20,21,22,23,24) (s. Material und Methoden). Wie aus Tab. 7 deutlich wird, sollte das Phagenkonzentrat vor dem osmotischen Schock einen Titer von  $2 \times 10^{13}$ /ml nicht überschreiten. Die auf der Lyse vereinzelter Phagen beruhende Viskosität vor dem Schock wird am Besten durch DNase-Zusatz beseitigt: der Anteil überlebender Phagen nach dem Schock sinkt dadurch nochmals um die Hälfte. Allen anderen Methoden erweist sich die von Fabricant und Kennell (24) als überlegen. Sie zeigt den höchsten Anteil biologisch aktiver ghosts, den geringsten Anteil überlebender Phagen und eine hohe Reproduzierbarkeit.

β) Biologische Aktivität der ghosts

Als Maß ihrer biologischen Aktivität wurde die Fähigkeit der ghosts, Bakterien abzutöten, gewertet. Da in manchen Medien mit einer Erholung der Bakterien von einer ghost-Infektion zu rechnen ist (25), wurde nicht nur das Ausmaß des Abtötens, sondern auch dessen mögliche Reversibilität im verwendeten Medium gemessen (Abb. 2). Vor allem werden zwei Dinge deutlich:

- Erstens, die Fähigkeit der ghosts die Bakterien abzutöten, wird durch UV-Bestrahlung vermindert. Ohne UV-Bestrahlung sind 27 % der ghosts in der Lage, zu töten; nach UV-Bestrahlung nur noch 18 % (30 min Wert, Abb. 2).
- Zweitens, aus der Parallelität der Wachstumskurven ergibt sich, daß in dem verwendeten Medium B und den benutzten Agarplatten keine Erholung der abgetöteten Bakterien erfolgt.

Da in Medium B der ghost-Effekt nicht reversibel ist, kann dieses für den Versuch, Alteration durch ghost-Infektion zu

| Methode              | Lit. | T4 <sup>+</sup> -Phagen-titer vorher | DNAse <sup>1)</sup> | überlebende Phagen in % | Zahl der Versuche | Standard-abweichung | physik. vorhandene / biolog. aktive ghosts |
|----------------------|------|--------------------------------------|---------------------|-------------------------|-------------------|---------------------|--------------------------------------------|
| Fabricant & Kennell  | (24) | 1.8x10 <sup>13</sup>                 | +                   | 0.10                    | 7                 | 0.10                | 3.5                                        |
| Herriott & Barlow    | (20) | 1.8x10 <sup>13</sup>                 | -                   | 0.36                    | 3                 |                     | >5.0                                       |
| French & Siminovitch | (22) | <2 x10 <sup>13</sup>                 | -                   | 0.23                    | 13                | 0.28                | 6.0                                        |
| "                    | "    | <2 x10 <sup>13</sup>                 | +                   | 0.11                    | 4                 |                     |                                            |
| "                    | "    | 3 x10 <sup>13</sup>                  | -                   | 0.85                    | 14                | 0.25                |                                            |
| "                    | "    | 5.6x10 <sup>13</sup>                 | -                   | 81.00                   | 1                 |                     |                                            |
| Duckworth            | (19) | 1.8x10 <sup>13</sup>                 | -                   | 0.54                    | 3                 |                     |                                            |
| Hofschneider         | (21) | 1.8x10 <sup>13</sup>                 | -                   | 0                       | 1                 |                     | >40                                        |
| Laemmli              | (23) | 1.2x10 <sup>13</sup>                 | -                   | 0.58 <sup>3)</sup>      | 1                 |                     | >40                                        |
| "                    | "    | 1.2x10 <sup>13</sup>                 | -                   | 0.003 <sup>4)</sup>     | 1                 |                     |                                            |

Tab. 7 Methodenvergleich zur Herstellung von T4-ghosts

- 1) 3 µg/ml DNAse im Phagenkonzentrat vor dem Schock.
- 2) Die Zahl der physikalisch vorhandenen ghosts errechnet sich aus dem ursprünglichen Phagentiter und der beim Schocken eingetretenen Verdünnung. Die Zahl der biologischen aktiven ghosts errechnet sich nach der POISSON-Verteilung aus dem Anteil lebender Bakterien beim Überlebenstest (s. Abb. 4 und Material und Methoden).
- 3) 4 x Einfrieren / Auftauen
- 4) 6 x Einfrieren / Auftauen

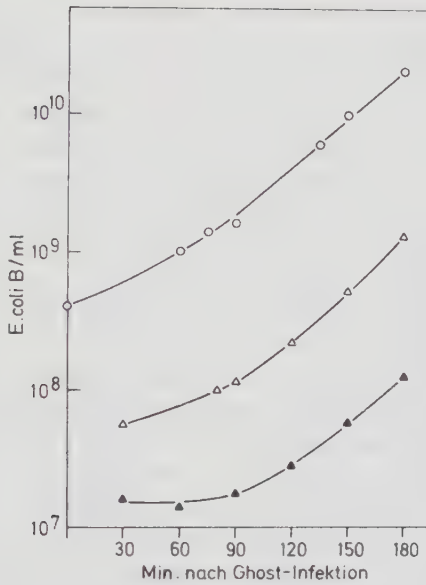


Abb. 2    Zeitlicher Verlauf des Wachstums aus E.coli B nach ghost-Infektion

T4-Phagen wurden nach Fabricant & Kennell (24) osmotisch geschockt (<0.1 % Überlebende) und zum Teil 6.5 min UV-bestrahlt (s. Material und Methoden).

Mit einer *moi* von 13.5 wurde E.coli B mit diesen ghosts infiziert (37°C). 15 min nach Infektion wurden die mit unbestrahlten ghosts infizierten Bakterien (▲), die mit bestrahlten ghosts infizierten (Δ) und die nicht infizierte Kontrolle (○) mit Medium verdünnt und eine Kinetik des Wachstums der überlebenden Koloniebildner aufgenommen.

erzeugen, verwendet werden. UV-Bestrahlung sollte vermieden werden, da diese nicht nur intakte Phagen (Abb. 3) sondern auch ghosts, jedenfalls partiell, inaktiviert. Daher muß die osmotische Schockmethode so effizient und trotzdem schonend sein, daß bei ausreichender  $moi$  an biologisch aktiven ghosts die gleichzeitig damit gegebene  $moi$  an intakten, überlebenden Phagen vernachlässigbar ist. Diese Bedingungen werden praktisch nur von der Methode nach Fabricant & Kennell erfüllt. Daher wurden nach ihr hergestellte ghosts verwendet, um die Alteration der RNA-Polymerase auszulösen.

$\gamma$ ) ghost-Infektion führt nicht zur Alteration

Sowohl unter Modifikations- (Tab. 8,a) als auch Alterationsbedingungen (Tab. 8,b) gelang es, E.coli B zu 95 % mit ghosts zu töten und dabei den Anteil der Phagen-infizierten Zellen vernachlässigbar klein zu halten. Tab. 8,c und d zeigt die entsprechenden Kontrollen mit intakten Phagen. Die Aufarbeitung der RNA-Polymerasen aus diesen Bakterien ergab, wie zu erwarten,  $E_M$  bzw.  $E_A$  (bei Tab. 8,c bzw. d). Die ebenfalls durch Elektrophorese auf Celluloseacetatstreifen analysierten Enzyme der beiden ghost-infizierten Bakterienpräparationen zeigten nur  $E_N$ . Daraus ergibt sich, daß Adsorption an die Wirtsmembranen und deren Penetration nicht den Auslösemechanismus der Alteration darstellt. Zu Adsorption und Penetration sind ghosts ebenso wie intakte Phagen befähigt (25), allerdings ohne DNA und die daran gebundenen internen Kopfproteine injizieren zu können. Da nicht bekannt ist, ob bei der ghost-Präparation an den Phagenpartikeln außer dem Verlust von DNA und den internen Kopfproteinen durch die geplatzte Kopfmembran (26, 27) auch noch andere Schäden auftreten, wurde versucht, mit  $T4^+$ -Phagen, die nur durch UV-Bestrahlung inaktiviert wurden, die Alteration auszulösen.

d) Löst Infektion mit UV-bestrahlten T4-Phagen die Alteration aus?

Unter den gewählten Bedingungen der UV-Bestrahlung überleben

| Bakterien-<br>titer<br>vorher | Chloramphenicol | moi an<br>ghost<br>Partikeln | moi an<br>intakten<br>Phagen | moi an<br>biol. akt.<br>ghosts 1) | physik.vorh.ghosts<br>biol.akt.ghosts | % über-<br>lebende<br>Bakterien | % durch<br>Phagen<br>getötete<br>Bakterien | % durch<br>ghosts<br>getötete<br>Bakterien |
|-------------------------------|-----------------|------------------------------|------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------|--------------------------------------------|--------------------------------------------|
| a $6.6 \times 10^9$           | -               | 11.45                        | 0.016                        | 3.67                              | 3.12                                  | 2.5                             | 1.5                                        | 96                                         |
| b $7.1 \times 10^9$           | +               | 10.65                        | 0.015                        | 3.03                              | 3.52                                  | 4.8                             | 1.5                                        | 93.7                                       |
| c $6.5 \times 10^9$           | -               | 0                            | 3.85                         | 4.09                              | 0.94                                  | 1.67                            | 98.3                                       | 0                                          |
| d $6.5 \times 10^9$           | +               | 0                            | 3.85                         | 3.96                              | 0.97                                  | 3.23                            | 96.8                                       | 0                                          |

Tab. 8 Infektion von E.coli B durch T4-ghosts oder T4-Phagen unter Alterations-  
und Modifikationsbedingungen

Sowohl zur ghost- (a,b) als auch Phagen-Infektion (c,d) wuchs E.coli B jeweils im 2 l Maßstab in Medium B. Sowohl die Phagen als auch die ghosts (Präparation nach (24); Phagen-Ausgangstiter  $1.8 \times 10^{13}$ /ml; 0.13 % Überlebende) wurden, gelöst in Medium B, in je einem Volumen von 900 ml zugegeben. Bakterienerte und Zugaben von Tryptophan, CAM oder  $\text{Na}_3\text{N}$  im Alterations-(b,d) oder Modifikationsversuch (a,c) folgten zeitlich und mengenmäßig den Angaben in Tab. 1.

1) Berechnet aus Überlebensrate der Bakterien und POISSON-Verteilung (s. Material und Methoden).

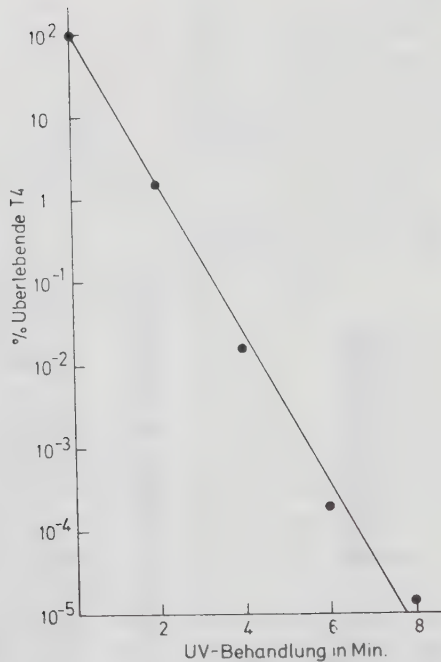


Abb. 3    UV-Inaktivierung von T4<sup>+</sup>

Ein T4<sup>+</sup>-Lysat mit einem Titer von  $1.86 \times 10^{11}$ /ml wurde UV-bestrahlt und die Abnahme des Phagentiters im Phagentest zeitlich verfolgt (s. Material und Methoden).

nur je 1.5 % der eingesetzten T4-Phagen eine Bestrahlungsdauer von zwei Minuten (Abb. 3). Die Fähigkeit bestrahlter und unbestrahlter T4-Phagen Bakterien abzutöten, wurde zunächst in einem Experiment verglichen (Abb. 4). Es ergibt sich, daß Phagen nach UV-Bestrahlung nicht mehr so gut wie die unbestrahlte Kontrolle in der Lage sind, Bakterien zu inaktivieren. Vermutlich derselbe Effekt war auch schon für eine ghost-Präparation zu beobachten (Abb. 2).

Der Anteil überlebender Bakterien bei Infektion mit unbestrahlter

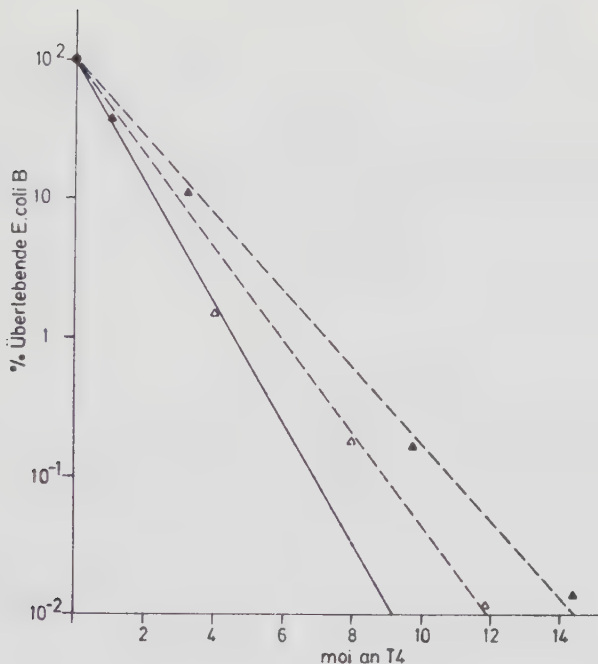


Abb. 4     Inaktivierung von E.coli B

E.coli B in Medium A wurde bei einer Zelldichte von  $6.2 \times 10^8$ /ml mit verschiedenen moi's bestrahlter (15 min UV) und unbestrahlter T4<sup>+</sup>-Phagen versetzt. Nach 15 min Adsorption bei 37°C wurden die Bakterien verdünnt und auf Agarplatten ausgestrichen. Die überlebenden Koloniebildner sind aufgetragen. Die ausgezogene Linie gibt die theoretische, aus der POISSON-Verteilung berechnete Überlebensrate an.

- ▲ : Verwendung bestrahlter Phagen  
 △ : Verwendung unbestrahlter Phagen

Phagen folgt bis zu einer moi von 4 dem aus der POISSON-Verteilung erwarteten Wert, und bestätigt somit, daß ein Phage zur Tötung ausreicht. Bei den UV-bestrahlten Phagen trifft dies nicht zu. Die rechnerische Auswertung ergibt, daß unter ca. 1.8 UV-bestrahlten Phagen nur einer in der Lage ist, ein Bakterium zu inaktivieren.

UV-bestrahlte Phagen waren auch nicht mehr in der Lage, die Wirts-RNA-Polymerase zu alterieren.

In diesem Experiment wurde E.coli B in Medium B bei einer Zelldichte von  $4 \times 10^9$ /ml unter Alterationsbedingungen (s. Material und Methoden) mit unbestrahlten oder 8 min UV-bestrahlten  $T4^+$ -infiziert (moi jeweils 6.2; 0.5 bzw. 0.8 % überlebende Bakterien). Die elektrophoretische Analyse der gereinigten RNA-Polymerase auf Cellogel zeigte nur bei Infektion mit unbestrahlten Phagen Alteration. Nach Infektion mit bestrahlten Phagen lag normale RNA-Polymerase vor.

- e) Sind die bisher bekannten internen Kopfproteine an der Alteration beteiligt?

Da, wie sich später als richtig erwies, die Unabhängigkeit der Alteration von Proteinsynthese auf der Einschleusung der Alterationstransferase durch den infizierenden Phagen in die E.coli-Zelle beruhen kann, mußten alle hierfür in Frage kommenden Phagenproteine überprüft werden. Bei  $T4$  waren bisher drei verschiedene interne Kopfproteine bekannt, die an DNA binden und bei der Infektion mit dieser in das Bakterium injiziert werden (28,29). Analysiert wurden eine Mutante, die keines der drei internen Proteine enthält ( $T4IP^0$ ) und eine, der das interne Protein I fehlt ( $T4IP_I^-$ ) (30).

Hierzu wurde E.coli B bei einer Zelldichte von  $5 \times 10^8$ /ml in Medium A mit  $T4IP_I^-$  (moi 4),  $T4IP^0$  (moi 5) oder zur Kontrolle  $T4^+$  (moi 5) sowohl unter Alterations- als auch Modifikationsbedingungen infiziert. Die gereinigten RNA-Polymerasen wurden auf Cellogel (bei  $T4^+$  und  $T4IP_I^-$ ) oder im Harnstoff-Polyacrylamidgel ( $T4IP^0$ ) analysiert (Abb. 5). Die  $\alpha$ -Banden wurden aus den Gelen ausgeschnitten und durch nochmalige Auftrennung in SDS-Polyacrylamidgel identifiziert.

Es zeigte sich, daß unter CAM durch  $T4IP_I^-$ ,  $T4IP^0$  genauso wie durch  $T4^+$  eine Alteration der RNA-Polymerase ausgelöst wird. Unter Modifikationsbedingungen führt eine Infektion mit jedem dieser Phagen auch zur Modifikation der RNA-Polymerase.

Daraus folgt, daß keines der drei bekannten internen Kopfproteine des Bakteriophagen  $T4$  für die Alteration oder Modi-

fikation verantwortlich sein kann.

- f) Freisetzung und Charakterisierung der Alterationstransferase aus  $T4^+$ -Phagen.

Schließlich gelang es, die Alterationstransferase in Präparationen von osmotisch geschockten  $T4^+$ -Phagen nachzuweisen, sie daraus zu reinigen und zu charakterisieren (14). Als beste Methode zu ihrer Freisetzung erwies sich, wie schon bei der Präparation biologisch aktiver ghosts, der osmotische Schock nach Fabricant & Kennell (Tab. 7) (24).

Das Enzym ADP-ribosyliert unter Verbrauch von  $NAD^{\oplus}$  Argininsseitenketten von Proteinen. Diese  $NAD^{\oplus}$ :Protein ADP-Ribosyltransferase aus dem Bakteriophagen T4 hat keine hohe Spezifität in Bezug auf das zu beladende Protein. Das Molekulargewicht beträgt 70.000 und es sind ca. 40 Moleküle pro Phage enthalten (31). Im Gegensatz zu den drei bisher bekannten internen Kopfproteinen bindet es nicht an DNA. Es wird aber trotzdem bei der Infektion zusammen mit der DNA und den anderen internen Kopfproteinen in den Wirt injiziert.

Dies erklärt, warum auch unter Bedingungen vollständig gehemmter Protein- oder RNA-Synthese die Alteration rasch und ungestört abläuft.

Außerdem können die alternativen Erklärungsweisen der Alteration (durch Phagen ausgelöste latente Wirtskapazität oder unvollständige Modifikation durch nicht völlig gehemmte T4-DNA-abhängige Proteinsynthese) als widerlegt gelten.

Mit Hilfe von Mutanten des Phagen T4, die nicht mehr alterieren ( $alt^-$ ) oder nicht mehr modifizieren können ( $mod^-$ ) (32) war es möglich, die  $NAD^{\oplus}$ :Protein ADP-Ribosyltransferase eindeutig als Alterationsenzym zu erkennen:

- 1) Nur in  $T4 alt^-$ -Phagen (nicht aber in  $T4^+$  oder  $T4mod^-$ ) fehlt ein Protein mit dem Molekulargewicht isolierter  $NAD^{\oplus}$ :Protein ADP-Ribosyltransferase.

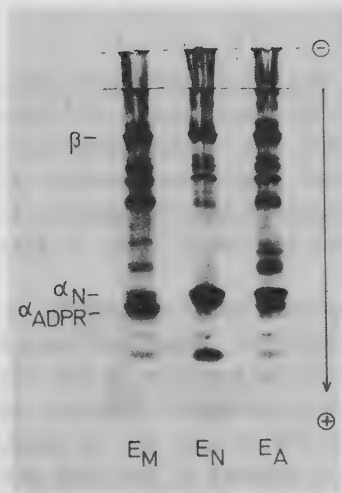


Abb. 5    Elektrophoretische Auftrennung im Harnstoff-  
Polyacrylamidgel

Aufgetrennt im Harnstoff-Polyacrylamidgel (8 M Harnstoff, s. Material und Methoden) wurden je 30  $\mu$ g RNA-Polymerase aus uninfizierten E.coli B (mittlere Bahn) unter Modifikationsbedingungen T4IP $^0$  infiziert (linke Bahn) und unter Alterationsbedingungen T4IP $^0$  infiziert (rechte Bahn).

2) Die Alterationstransferase-Aktivität läßt sich nur in T4 $^+$  oder T4 mod $^-$  Phagen (nicht aber in T4 alt $^-$ ) nachweisen (14).

Wie in vivo so sind auch in vitro mit Alterationstransferase nur maximal 50 % der  $\alpha$ -Untereinheiten der RNA-Polymerase ADP-

ribosylierbar.  $\alpha_M$  in modifizierter RNA-Polymerase ist kein Akzeptor. Die in vitro mit einem ADP-Ribosyl-Rest beladenen  $\alpha$ -Untereinheiten laufen in der Cello-gel-Elektrophorese wie  $\alpha_A$  oder  $\alpha_M$ . Entsprechend dem in vivo unter Alterationsbedingungen beobachtbaren, relativ zu  $\alpha_A$  geringem Einbau von Phosphatresten in  $\beta'$ ,  $\beta$  und auch  $\sigma$  (12,13,5), werden auch in vitro diese Untereinheiten durch die Alterationstransferase relativ schwach ADP-ribosyliert. Bei funktionierender Proteinsynthese kommt es in vivo nach 3 min zu einem Ausbau der  $^{32}\text{P}$ -Markierung aus den Untereinheiten  $\beta'$ ,  $\beta$  und  $\sigma$  der alterierten Polymerase, während unter CAM die ADP-Ribosereste stabil gebunden bleiben. Vermutlich kommt dieser Ausbau durch ein noch unbekanntes prä-replikatives T4-Protein zustande (5).

#### g) Anmerkungen zur Nomenklatur

Alteration und Modifikation waren zunächst operational verschieden definiert (2). Durch T4-Mutanten läßt sich beweisen, daß es sich um zwei verschiedene Prozesse handelt.

Die Alterationstransferase, die der Phage bei der Infektion injiziert, ist als  $\text{NAD}^+$ :Protein ADP-Ribosyltransferase sicher nachgewiesen (14). Die Modifikationstransferase ist ein prä-replikatives T4 Protein, dessen Isolierung und Charakterisierung aus T4-infizierten Zellen erst kürzlich gelang (s. S. 33). Da sich  $\alpha_A$  und  $\alpha_M$  als chemisch identisch erweisen (9), tritt also nach Phageninfektion mit und ohne CAM ADP-ribosyliertes  $\alpha$  auf, das in einem Fall als  $\alpha_A$ , das andere Mal als  $\alpha_M$  bezeichnet wurde. Wegen dieser chemischen Identität hat die Unterscheidung zwischen  $\alpha_A$  und  $\alpha_M$  nur noch den Sinn, die Herkunft genauer zu bezeichnen.

Horvitz hat unter Alterationsbedingungen das Auftauchen von  $\alpha_M$  beschrieben (5). Wir wissen, daß dieses " $\alpha_M$ " durch Alterationstransferase entsteht und daher als  $\alpha_A$  zu bezeichnen wäre. Nach Infektion mit T4 alt<sup>-</sup> tritt es auch nicht auf, wohl aber nach T4 mod<sup>-</sup> Infektion.

Horvitz weiß nicht, ob es sich bei der von ihm  $\alpha_A$  genannten Bande wirklich um eine  $\alpha$ -Polypeptidkette handelt. Da sie nur im Autoradiogramm, nicht aber bei Anfärbung auf Protein erscheint (5, 31), vermuten wir ein mit der RNA-Polymerase unspezifisch copräzipitierendes Produkt. Bei der geringen Akzeptorspezifität der Alterationstransferase ist auch die ADP-Ribosylierung einer solchen Verunreinigung denkbar. So wird die Einschätzung von Horvitz, daß die Alteration nur relativ wenige  $\alpha$  Moleküle betrifft, erklärlich (5).

Goff bezeichnet den von ihm in einem Extrakt aus T4-infizierten Zellen beobachteten Einbau von ADP-Ribose aus NAD<sup>+</sup> in die  $\alpha$ -Untereinheit von RNA-Polymerase als in vitro Modifikation (4). Bei genauer Betrachtung scheint er aber in vitro die Alterationsreaktion untersucht zu haben. Daß es sich um eine nicht reversible ADP-Ribosylierung von Arginin-Seitenketten handelt, gilt für das Modifikationsenzym genauso wie für das Alterationsenzym (14 und R. Skorko, persönliche Mitteilung). Daß  $\alpha_M$  in modifizierter RNA-Polymerase kein Akzeptor mehr ist, und daß die NAD<sup>+</sup>:Protein-ADP-Ribosyltransferase bei 37°C instabil ist, trifft für Alterationstransferase zu und gilt auch für Modifikationstransferase (33,14,4). Die folgenden vier Punkte lassen aber Goff's Annahme als fraglich erscheinen und sprechen eher dafür, daß er die Alteration untersucht hat.

1. Goff's "Modifikation" von  $\alpha_N$  in EN betrifft nur bis 50 % der  $\alpha$ -Menge (4,34). Dies entspricht den in vivo- und in vitro-Verhältnissen für Alteration, nicht aber für Modifikation, bei der ja alle  $\alpha$ -Untereinheiten ADP-ribosyliert werden.
2. Die angegebene Kinetik des Auftauchens der Modifikationstransferase (Aktivitätsmaximum 2 min nach Infektion bei 30°C) (4) ist zu schnell für ein mittleres T4-Protein. Sie paßt aber gut zur Kinetik der Alteration.
3. Ein nach Goff präparierter Extrakt aus T4 mod<sup>-</sup> infizierten E.coli B zeigt die ADP-Ribosyltransferase-Aktivität, nicht aber ein Extrakt aus T4 alt<sup>-</sup> infizierten Zellen (14).
4. Es wäre aus den bekannten Eigenschaften der Alterationstransferase unerklärlich, warum sie in Extrakten nach Goff inaktiv sein sollte.

## 2. Mechanismus der Modifikation

In T4-infizierten Zellen erfolgt die Modifikation der Polymerase- $\alpha$ -Untereinheit zwischen 2 und 4 min nach Infektion (37°C). Der angeheftete Rest bleibt während des gesamten Infektionszyklus stabil gebunden (2). Das relativ langsame Erscheinen der Modifikationstransferase ist durch CAM (2) oder andere Inhibitoren der Proteinsynthese hemmbar. Zusatz von Rifampicin unterdrückt noch 2 min (30°C) nach Infektion die Expression des mod-Genes vollständig (5). Daher gehört der Promotor des mod-Genes zu den mittleren T4-Genen und nicht zu den frühen T4-Genen, welche als erste nach Infektion aktiv sind. (Nach einem Nomenklaturvorschlag von Rabussay und Geiduschek (35) werden in dieser Arbeit die T4-Genklassen in

drei Gruppen eingeteilt: frühe Gene (vorher immediate early), mittlere Gene (ehemals in delayed early, quasi late und anti late aufgeteilt) und späte Gene (wie vorher late).

Erst vor kurzem gelang es, die Modifikationstransferase in T4 alt<sup>-</sup> infizierten E.coli B Zellen (nicht aber in T4 mod<sup>-</sup> infizierten Zellen nachzuweisen und sie daraus anzureichern (33). Das Auftreten dieses relativ kleinen Enzyms (Molekulargewicht um 30.000) folgt genau der schon bekannten Kinetik der Modifikation. Unter Verwendung von (<sup>3</sup>H)-NAD<sup>+</sup> baut es nur in die  $\alpha$ -Untereinheiten zugesetzter RNA-Polymerase Radioaktivität ein. Es zeigt damit die erwartete Spezifität und unterscheidet sich deutlich von der relativ unspezifischen Alterationstransferase. Auch in vitro ADP-ribosyliert die Modifikationstransferase beide  $\alpha$ -Untereinheiten normaler RNA-Polymerase. Isoliertes  $\alpha_N$  wird vollständig zu einfach ADP-ribosyliertem  $\alpha_M$  umgesetzt. Daß in vivo beide  $\alpha$ -Untereinheiten modifiziert, aber nur eine alteriert wird, zeigt das in Abb. 6 dargestellte Experiment.

Die Expression der T4-DNA-codierten Modifikationstransferase wird durch Rifampicin verhindert, während die injizierte Alterationstransferase ihre Wirkung entfalten kann. Rifampicin drückt den maximalen <sup>32</sup>P-Einbau unter Modifikationsbedingungen auf Alterationsniveau, d.h. auf die Hälfte. Die Kurve der Alteration bei steigender moi an T4 entspricht der Kurve des Anteils infizierter Zellen (aus der POISSON-Verteilung errechnet, s. Abb. 6a). Dies läßt den Schluß zu, daß ein Phage ausreicht, um in einer Zelle die RNA-Polymerase zu alterieren. Eine Verdreifachung der CAM-Konzentration bei einer moi 6 an T4<sup>+</sup> führte nicht zur Erniedrigung des Phosphateinbaus in  $\alpha$ . Dies zeigt, daß die im Experiment verwendete CAM-Konzentration zur Hemmung der Proteinsynthese ausreichend war.

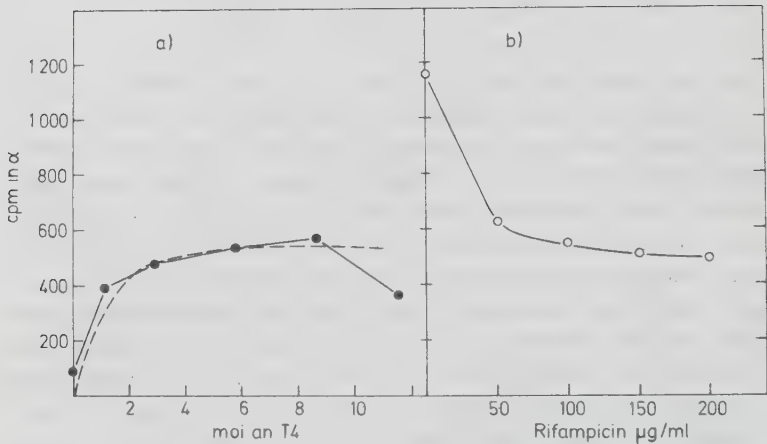


Abb. 6    Rifampicin-Hemmung der Modifikation und moi-Abhängigkeit  
der Alteration

E.coli wurde in Medium C mit 0,2 mM Phosphat bis  $3.8 \times 10^8$ /ml gezogen (37°C). Nach 15 min ( $^{32}\text{P}$ )-Phosphateinbau (20 µCi/50 ml Kulturvolumen) wurden die Bakterien entweder

- a) mit CAM versetzt, 3 min später mit  $\text{T4}^+$  infiziert und nach weiteren 5 min geerntet (●), oder
- b) 5 min mit steigenden Mengen Rifampicin behandelt, dann mit  $\text{T4}^+$  infiziert und 8 min später geerntet (○).

Je Meßpunkt wurden Bakterien aus 50 ml Kultur lysiert und mit Antiserum die RNA-Polymerase ausgefällt. Nach Auftrennung der Präzipitate im SDS-Polyacrylamidgel wurde die Radioaktivität der  $\alpha$ -Banden gemessen und nach Normalisierung auf gleiche Proteinmenge graphisch aufgetragen (s. Material und Methoden).

- steigende Mengen Rifampicin, kein CAM, moi 7 an  $\text{T4}^+$  Konstant.
- kein Rifampicin, 100 µg/ml CAM, steigende moi an  $\text{T4}^+$ .
- Theoretische, aus der POISSON-Verteilung berechnete Kurve des Anteils  $\text{T4}$ -infizierter Bakterien. Das Plateau gibt den Wert für 100 %ige Infektion an.

### 3. Strukturvorschlag für die ADP-Ribosylierung von $\alpha$ .

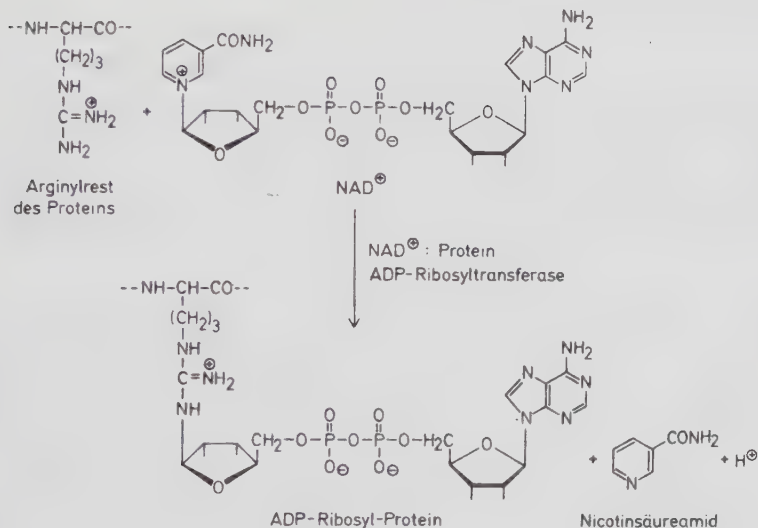


Abb. 7    Strukturvorschlag

Für die Alterationsreaktion ist die Übertragung von ADP-Ribose-resten auf Arginin-Seitenketten bewiesen (14). Wegen der Identität von  $\alpha_A$  und  $\alpha_M$  muß sie für die Modifikationsreaktion analog gelten. Die Gleichheit von  $\alpha_A$  und  $\alpha_M$  wird durch viele Fakten gestützt.

Das sind im einzelnen das völlig identische elektrophoretische Verhalten von  $\alpha_A$  und  $\alpha_M$  (Abb. 1), wie auch das für  $(^{32}P)\alpha_A$  und  $(^{32}P)\alpha_M$  (beide in vivo markiert) exakt gleiche Muster sowohl der Peptidverteilung als auch der Radioaktivität bei zweidimensio-

naler Auftrennung der tryptischen Peptide (9). In saurem oder alkalischem Milieu zeigen  $\alpha_A$  und  $\alpha_M$  gleiches Stabilitätsverhalten (Tab. 4) (14, 4). Ferner ist für die Modifikation zumindest die Anheftung von ADP-Resten bewiesen (s. Kapitel I), wobei die Modifikationstransferase wie auch die Alterationstransferase  $\text{NAD}^+$  als Substrat verwendet (33).

$\text{NAD}^+$ , in E.coli in einer Konzentration von etwas mehr als 1 mM enthalten, ist das relativ langsam durch  $(^{32}\text{P})$ -Phosphat-Zugabe markierte Substrat für Alteration und Modifikation. Dies ist vermutlich der Grund, warum für maximalen Einbau in die  $\alpha$ -Untereinheiten das  $(^{32}\text{P})$ -Phosphat mindestens eine viertel Generationszeit vor Phageninfektion in das Medium gegeben werden muß (s.S.4).

Durch die Beladung von poly-L-Arginin (14) mit mehreren ADP-Ribose-resten konnte die Anheftung an die Guanidogruppe des Arginins bewiesen werden. Die Akzeptoraktivität anderer Proteine geht deren Arginingehalt parallel. Poly-L-Lysin ist kein Akzeptor. Die Bindung zwischen der Guanidogruppe des Arginins und dem C-1-Atom der terminalen Ribose des ADP-Riboserestes könnte zur Schiffischen Base oder zum N-Glykosid führen. Die Hydrolysierbarkeit Schiffischer Basen in saurem Milieu und ihre Stabilität unter alkalischen Bedingungen steht aber im Widerspruch zum Hydrolyseverhalten von ADP-ribosyliertem  $\alpha$ . Daher ist die Anheftung der ADP-Ribose über eine N-Glykosidbindung wahrscheinlicher. Welches Stickstoffatom der Guanidogruppe die Bindung zur ADP-Ribose eingeht, und ob diese als  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Glykosidbindung geschlossen wird, ist allerdings ungeklärt. Die Spaltung der energiereichen Nicotinamid-Ribosid-Bindung im  $\text{NAD}^+$  liefert die Triebkraft der Reaktion. Die freie Energie der Hydrolyse dieser Bindung beträgt ca. -8.2 kcal/Mol bei pH 7 und 25°C (36).

Die reversible Inaktivierung des Mammalia-Proteinsynthese-Elongationsfaktors  $\text{EF}_2$  durch ADP-Ribosylierung wird von Diphtherietoxin unter  $\text{NAD}^+$ -Verbrauch katalysiert (37). Trotz großer Anstrengungen konnte die Verknüpfungsstelle zwischen ADP-Ribose und  $\text{EF}_2$  noch nicht identifiziert werden (38, 39). Dies gilt auch für alle anderen bekannten Protein-ADP-Ribose-Bindungen in Eukaryonten (40,15, 41,42).

Neben der Stöchiometrie des Phosphat- und Adeningehaltes und den Abspaltversuchen erlauben auch Stabilitätsbetrachtungen Aussagen zur Struktur der veränderten  $\alpha$ -Untereinheit. Die Bindung zwischen angeheftetem Rest und Protein in ADP-ribosyliertem  $\alpha$  ist im sauren Milieu stabiler als im alkalischen. Entsprechendes Verhalten zeigt ADP-ribosyliertes EF<sub>2</sub> Protein (43). Dagegen ist die Phosphoamid-Bindung (direkte Stickstoff-Phosphor-Bindung) zwischen dem Phosphor des AMP-Restes und der  $\epsilon$ -Aminogruppe einer Lysinseitenkette im intermediär auftretenden DNA-Ligase-Adenylat alkalistabil, jedoch säurelabil (44). Dieser Bindungstyp scheidet daher ebenso aus wie die Kohlenstoff-Phosphorbindungen, wie sie in Phosphocreatin oder Phosphoarginin vorkommen. Diese sind im sauren Milieu wesentlich stabiler als die Bindung zwischen ADP-Ribose und  $\alpha$ -Untereinheit (45).

#### 4. Zusammenfassung von Kapitel II

Es gelang, ein neues, jedoch wie alle bisher bekannten ebenfalls nicht essentielles, internes Phagenprotein, das bei der Infektion in den Bakterienwirt injiziert wird, nachzuweisen. Es handelt sich um eine NAD<sup>+</sup>:Protein ADP-Ribosyltransferase, die nicht nur bis zu 50 % der RNA-Polymerase  $\alpha$ -Untereinheiten, sondern auf Grund ihrer geringen Substratspezifität alle anderen RNA-Polymerase-Untereinheiten und auch andere Proteine ADP-ribosyliert. Die beschriebenen enzymologischen Eigenschaften und die Heranziehung einer T4 alt<sup>-</sup>-Mutante liefern den Beweis, daß dieses neue Enzym die Ursache der Proteinsynthese-unabhängigen Alteration der RNA-Polymerase ist. Phagenbruchstücke, Phagenghosts oder UV-bestrahlte T4-Phagen können nicht alterieren. Sie enthalten daher dieses Enzym überhaupt nicht, nicht in enzymatisch aktiver Form oder können es nicht in den Wirt injizieren. Die Fähigkeit der Phagenghosts und der UV-inaktivierten Phagen, den Wirt abzutöten, wird ihnen daher nicht durch die Alterationstransferase verliehen.

Bei T4-Infektion in Gegenwart von Rifampicin wird die Expression des T4 mod Genes verhindert, und daher auch der Phosphateinbau in  $\alpha$  um die Hälfte, d.h. auf Alterationsniveau gedrückt. Unstimmigkeiten in der Nomenklatur, die auf verschiedenen Mechanismen für Alteration und Modifikation einerseits, und der chemischen Identi-

tät von  $\alpha_A$  und  $\alpha_M$  andererseits beruhen, konnten geklärt werden.

Schließlich wurde eine für Alteration und Modifikation gültige Reaktionsgleichung vorgeschlagen.

### III. Biologischer Sinn von Alteration und Modifikation

#### 1. Einführung

Das Prinzip der Aktivitätskontrolle durch reversible kovalente Bindung chemischer Gruppen wurde zuerst bei Enzymen aus Säugerzellen erkannt. So wird z.B. Glykogen-Phosphorylase und auch die zugehörige Phosphorylase-Kinase durch Phosphorylierung aktiviert, während Glykogen-Synthetase, Pyruvatdehydrogenase und Fructose-1,6-diphosphatase nach Phosphorylierung in inaktiver Form vorliegen (46). Das bisher einzige Beispiel für strukturelle Modifikation eines bakteriellen Enzyms war die Aktivitätskontrolle der E.coli-Glutamin-Synthetase durch reversible Adenylylierung, d.h. Anheftung und Abspaltung von AMP-Resten (47).

Bei den folgenden Beispielen des Einbaus phosphathaltiger Verbindungen in Enzyme ist deren Bedeutung als reversibler Regulationsprozeß entweder noch nicht bekannt, oder nicht gegeben.

So stellt die adenylylierte Form der E.coli- bzw. T4-DNA-Ligase (das angeheftete AMP stammt aus  $\text{NAD}^+$  bzw. ATP) eine Zwischenstufe der Ligasereaktion dar (44). Der neben T4-Alteration und Modifikation einzige andere bekannte Fall der Übertragung einzelner ADP-Ribosereste ist die durch Diphtherietoxin (37) und Pseudomonas aeruginosa-Exotoxin (48) katalysierte ADP-Ribosylierung des Proteinsynthese Elongationsfaktors  $\text{EF}_2$  aus Rattenleber. Diese Reaktion ist zwar in vitro reversibel, die biologische Bedeutung eines reversiblen Regulationsprozesses kann diesem heterologen System aber nicht zugesprochen werden. Auch die Chromatin-assoziierte Poly-ADP-Ribosylierung von Protein in Eukaryontenkernen bleibt

wegen zum Teil widersprechenden Ergebnissen in der biologischen Bedeutung weiterhin unklar. Eine enge Beziehung zwischen Poly-ADP-Ribose-Synthese und DNA-Stoffwechsel ist allerdings schon seit längerem bekannt (49,50,51,52,53).

Um den biologischen Sinn der T4 induzierten Modifikation der E.coli RNA-Polymerase zu erkennen, wurden die Transkriptionseigenschaften modifizierter RNA-Polymerase ( $E_M$ ) mit denen von RNA-Polymerase aus uninfizierten Zellen ( $E_N$ ) in einem zellfreien, DNA-abhängigen Proteinsynthesystem verglichen. Als Maß für die Genexpression diente die Menge der in vitro Gen-abhängig synthetisierten Proteine (54). Das System besteht aus DNA, einem Extrakt aus E.coli (S-30; = 30.000 g Überstand), der alle für RNA- und Proteinsynthese nötigen Makromoleküle enthält und dem alle zu diesen Synthesen nötigen Salze und Substrate zugesetzt werden. Nach einer Stunde Inkubation werden die synthetisierten Proteine quantitativ gemessen. Um verschiedene RNA-Polymerasen vergleichen zu können, wurde eine neue Methode entwickelt:  $E_N$  und  $E_M$  wurden aus dem Rifampicin-resistenten E.coli Stamm AJ7 (55) isoliert und in Gegenwart von Rifampicin in das aus Rifampicin-sensitiven Zellen präparierte zellfreie System eingeführt. Unter diesen Bedingungen ist nur durch die zugegebene gereinigte RNA-Polymerase Transkription möglich. Einfache Ausschaltung der endogenen RNA-Polymerase durch Rifampicin und deren Ersatz durch zugegebene Rifampicin-resistente RNA-Polymerase, erlaubt den Vergleich der Transkriptionseigenschaften von verschiedenen RNA-Polymerasen.

## 2. Vergleich der Gesamt-RNA- und der Proteinsynthese

In einem einfachen in vitro RNA-Synthese-Ansatz, bestehend aus DNA, RNA-Polymerase und den zur RNA-Synthese nötigen Salzen und Substraten, zeigen  $E_N$  und  $E_M$  an drei verschiedenen Matrizen ( $\lambda$ -, T4- und Kalbsthymus-DNA) keine großen Unterschiede in der Aktivität (s. Tab. 9,a). Daß dieser einfache RNA-Syntheseansatz keine Spezifitätsunterschiede zwischen  $E_N$  und  $E_M$  erkennen läßt, könnte auf Fehlinitiation, d.h. dem Start der RNA-Synthese außerhalb von Promotoren (symmetrische Transkription) beruhen. Dieses Ergebnis ist nicht auf  $\sigma$ -Mangel zurückzuführen, da beide Enzympräparationen

| Synthesebedingungen                                               | zugegebene<br>RNA-Poly-<br>merase | DNA       |       |             |
|-------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|-----------|-------|-------------|
|                                                                   |                                   | $\lambda$ | T4    | Kalbsthymus |
| a) gereinigtes Trans-<br>skriptionssystem<br>( $^3\text{H}$ )-UTP | $\text{E}_\text{N}$               | 2380      | 3380  | 2140        |
|                                                                   | $\text{E}_\text{M}$               | 2700      | 4520  | 3840        |
| b) S-30, Rifampicin,<br>( $^3\text{H}$ )-UTP<br>20 min Einbau     | $\text{E}_\text{N}$               | 4810      | 15720 |             |
|                                                                   | $\text{E}_\text{M}$               | 1980      | 5610  |             |
|                                                                   | -                                 | 460       | 730   |             |
| c) S-30<br>Rifampicin, ( $^{14}\text{C}$ )-Leu<br>1 h Einbau      | $\text{E}_\text{N}$               | 790       | 4050  |             |
|                                                                   | $\text{E}_\text{M}$               | 200       | 3090  |             |
|                                                                   | -                                 | 100       | 230   |             |

Tab. 9    Gesamt RNA- und Proteinsynthese als Funktion der ver-  
wendeten Matriz e und RNA-Polymerase

RNA-Synthese und deren Messung als TCA fällbare Radioaktivität (a) erfolgten im gereinigten Transkriptionssystem wie beschrieben (61), jedoch mit folgenden Änderungen: 6.5  $\mu\text{g}$  der angegebenen DNA wurden im 0.1 ml Reaktionsansatz verwendet. Entweder 8.8  $\mu\text{g}$   $\text{E}_\text{N}$  oder 10  $\mu\text{g}$   $\text{E}_\text{M}$  wurden zugefügt.

Synthese und Messung der Produkte im gekoppelten System erfolgte wie unter Material und Methoden angegeben, aber mit folgenden Änderungen: 27.5  $\mu\text{g}$   $\lambda$  DNA oder 32.5  $\mu\text{g}$  T4-DNA wurden in einem 0.5 ml Reaktionsansatz, welcher 16.5  $\mu\text{g}$   $\text{E}_\text{N}$  bzw. 18.7  $\mu\text{g}$   $\text{E}_\text{M}$  enthielt, verwendet. Die Rifampicin-Konzentration betrug 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Mit 5  $\mu\text{Ci}$  ( $^3\text{H}$ )-UTP (b) oder 0.1  $\mu\text{Ci}$  ( $^{14}\text{C}$ )-Leucin (c) wurde radioaktiv markiert. Nach Stop der Synthese wurden 50  $\mu\text{l}$  Proben in TCA gewaschen, deren Radioaktivität bestimmt und als cpm angegeben.

$\sigma$ -gesättigt waren. Die Modifikation der  $\alpha$ -Untereinheiten verringert zwar die Affinität der  $\sigma$ -Untereinheit zu modifiziertem Minimalenzym, aber der  $\sigma$ -Gehalt von  $\text{E}_\text{M}$  wird weitgehend durch die Aufarbeitungsmethode bestimmt (1,2,56,57,58,59,60). Da T4-infizierte Zellen  $\sigma$  enthalten, bindet es nach Aufschluß infizierter Zellen und Zusatz normaler Minimal-Polymerase an diese und kann mit ihr gereinigt werden (13).

Enzymatische Unterschiede zwischen normaler und modifizierter RNA-Polymerase sind die von Khesin beschriebene verringerte Kompetitor-Aktivität von spät aus T2-infizierten Zellen isoliertem modifiziertem Minimalenzym mit Holoenzym und eine veränderte Ionenstärkeabhängigkeit von  $E_M$  (60,62,63). Der Terminationsfaktor  $\rho$ , der mit  $E_N$  nur bei niedriger Ionenstärke interagiert (64,65,66), wechselwirkt mit  $E_M$  oder  $E_A$  auch bei höherer Ionenstärke (67). Viele beschriebene enzymatische Unterschiede zwischen  $E_N$  und  $E_M$  sind darauf zurückzuführen, daß  $E_M$  meist weniger  $\sigma$  enthält (68,69 und eventuell auch 62).

T4-modifiziertes Minimalenzym ist aber genauso wie normales Minimalenzym mit  $\sigma$  stimulierbar (56,70). Beide Enzymtypen transkribieren dann auch in vitro von T-Phagen-DNA nur den l-Strang, synthetisieren also nur frühe RNA (56,71,58,72). Dem entspricht auch die völlige Identität der im zellfreien System an T4-DNA unter Einsatz von  $E_N$  oder  $E_M$  synthetisierten Proteine (Abb. 8).

Bei einem Vergleich von  $E_N$  und  $E_M$  an  $\lambda$ - und T4-DNA im zellfreien gekoppelten System, treten Spezifitätsunterschiede sowohl zwischen den Enzymen wie auch den DNAs auf. Wie schon geschildert, ist der S-30 Extrakt, dessen endogene RNA-Polymerase durch Rifampicin blockiert ist, nur zur RNA-Synthese und deren Translation in Protein befähigt, weil die zugegebene Polymerase Rifampicin-resistent ist. Da im S-30 sowohl Synthese als auch Abbau der transkribierten RNA gleichzeitig ablaufen, kommt es zu einem Gleichgewichtszustand maximalen RNA-Gehalts, der nach etwa 20 min erreicht ist. Daher wurde die quantitative Bestimmung der synthetisierten RNA schon nach dieser Zeit vorgenommen (Tab. 9,b). T4-DNA ist wahrscheinlich auf Grund der größeren Zahl und Stärke ihrer Promotoren etwa dreimal so aktiv wie  $\lambda$ -DNA. Die im Vergleich zum reinen Transkriptionssystem (Tab. 9,a) auftretenden Unterschiede beruhen sicherlich zum Teil darauf, daß RNAs, deren Synthese nicht an echten Promotoren begann, an ihrem 5'-Ende auch keine Bindungsstelle zur 16-S rRNA der Ribosomen tragen (73,74). Unbedeckt von Ribosomen sind sie dem Angriff von Nukleasen verstärkt ausgesetzt (75,76). Da aus den erwähnten Gründen an Promotoren gestartete RNA-Ketten von Ribosomen besser erkannt und translatiert werden,

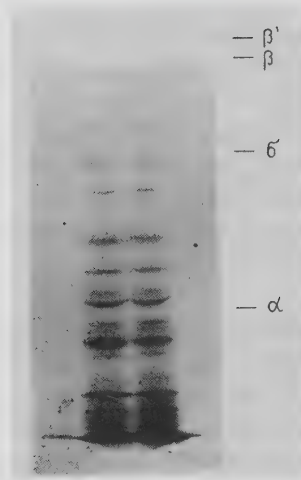


Abb. 8    Autoradiogramm der elektrophoretischen Auftrennung von  
in vitro T4-DNA-abhängig synthetisierten Proteinen im  
5-10 % logarithmischen SDS-Polyacrylamid-Gradientengel

In Gegenwart von Rifampicin beruht die Synthese der T4-Proteine auf der Zugabe von Rifampicin-resistentem  $E_N$  (links, 157  $\mu$ g) oder  $E_M$  (rechts, 182  $\mu$ g). Zur Radioaktivitätsmarkierung wurde je 0.5 ml Proteinsyntheseansatz 10  $\mu$ Ci einer ( $^{14}$ C)-Aminosäuremischung gegeben. Nach 1 h Inkubation waren davon 17 % ( $E_N$ ) bzw. 14.5 % ( $E_M$ ) in TCA fällbares Material eingebaut. Als Molekulargewichtsmaßstab sind die Positionen von RNA-Polymerase-Untereinheiten eingezeichnet.

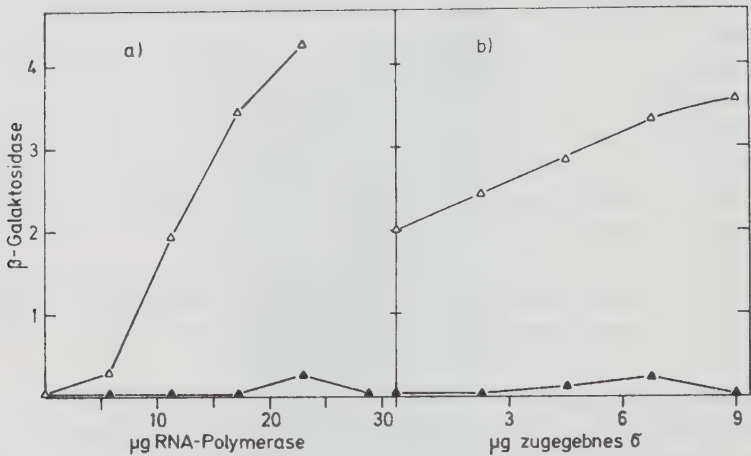
kann von der Gesamtpeptidsynthese im S-30 noch größere Spezifität erwartet werden. Daher wurde das Ausmaß der Proteinsynthese gemessen (Tab. 9,c).  $E_N$  zeigt an  $\lambda$ -DNA eine siebenmal größere Aktivität als  $E_M$ . Im Gegensatz dazu sind beide Enzyme an T4-DNA etwa gleich aktiv. Dieses Ergebnis entspricht wiederum der in

Abb. 8 dargestellten, sowohl quantitativen als auch qualitativen Gleichartigkeit der mit  $E_N$  und  $E_M$  an T4-DNA exprimierten Genprodukte. Die Fähigkeit, translatierbare RNA zu synthetisieren, wird für  $\lambda$ -, nicht aber für T4-DNA durch Modifikation der Wirts-RNA-Polymerase drastisch eingeschränkt. Weitere Versuche dieser Art zeigten, daß sich E.coli-DNA wie  $\lambda$ -DNA verhält (Ergebnisse nicht gezeigt). Nachdem diese relativ grobe Analyse einen Überblick geschaffen hatte, wurde im Folgenden die quantitative Expression einzelner Gene untersucht:

### 3. Modifikation der RNA-Polymerase als T4-induzierte negative Transkriptionskontrolle bakterieller Gene.

Das gekoppelte System wurde verwendet, um die Effektivität der Transkription von  $E_N$  und  $E_M$  an drei verschiedenen Typen von E.coli Genen, dem lac Operon, dem trp Operon und dem  $su_{III}^+$  tRNA-Gen zu vergleichen. Hierbei wurde an zwei verschiedenen DNAs im gekoppelten System das  $\beta$ -Galaktosidasegen transkribiert und translatiert. Die Menge synthetisierter  $\beta$ -Galaktosidase wurde im Enzymtest bestimmt. Zur Untersuchung des lac Operons wurde  $\lambda$  plac 5 DNA benutzt. Die DNA dieses transduzierenden Phagen enthält das E.coli lac Operon einschließlich des zugehörigen Promotors. Es ist bekannt, daß bei dieser DNA das  $\beta$ -Galaktosidasegen zur Hälfte vom lac Promotor und zur anderen Hälfte von einem anderen Promotor aus (wahrscheinlich einem  $\lambda$  Promotor) transkribiert wird (54).

Die in Tab. 10 und Abb. 9,a dargestellten Ergebnisse zeigen, daß die Modifikation der RNA-Polymerase deren Fähigkeit zur Expression des  $\beta$ -Galaktosidasegens um mehr als den Faktor zehn verringert. Die geringe  $\beta$ -Galaktosidase Synthese bei Zugabe *k l e i n e r* Mengen  $E_N$  ist sehr reproduzierbar (s. Abb. 9,a). Sie könnte auf kompetitiver Hemmung der zugegebenen Rifampicin-resistenten RNA-Polymerase (6  $\mu$ g) durch die endogene Rifampicin-sensitive Polymerase (ca. 30  $\mu$ g) in Gegenwart von Rifampicin beruhen. Diese Kompetition führt in vivo in heterogenoten Zellen zur Dominanz der Rifampicin-Sensitivität über die Rifampicin-Resistenz (77). Erst bei größeren Mengen zugegebener RNA-Polymerase wird die Antwort proportional zur Polymerasekonzentration, bis schließlich ein



**Abb. 9** Vergleich der  $\beta$ -Galaktosidase-Synthese mittels  $E_N$  und  $E_M$  in einem  $\lambda$  plac 5 DNA-abhängigen in vitro-System ohne (a) oder mit (b) zusätzlichem  $\sigma$

Bedingungen der zellfreien Synthese wie bei Material und Methoden beschrieben. Rifampicin war in allen Ansätzen enthalten. Bei (a) wurde 22.5  $\mu$ g  $\lambda$  plac 5 DNA von  $E_N$  ( $\Delta$ ) oder  $E_M$  ( $\blacktriangle$ ) in den jeweils angegebenen Mengen transkribiert. Bei (b) wurden steigende Mengen  $\sigma$ -Untereinheit zu Syntheseansätzen mit entweder 12  $\mu$ g  $E_N$  ( $\Delta$ ) oder 17  $\mu$ g  $E_M$  ( $\blacktriangle$ ) gegeben. Jeder Inkubationsansatz hatte ein Volumen von 0.5 ml. Die  $OD_{420}$  nach 1 h  $\beta$ -Galaktosidasetest ist aufgetragen.

Niveau maximaler  $\beta$ -Galaktosidase-Synthese erreicht wird. Wie Tab. 10 zeigt, kann die Synthesekapazität des S-30 in Abwesenheit von Rifampicin durch zusätzliche Polymerase beträchtlich gesteigert werden. Um auszuschließen, daß die geringe Aktivität von  $E_M$  auf einem  $\sigma$ -Mangel beruht, wurden vor Synthesestart steigende Mengen  $\sigma$  zugegeben (Abb. 9,b). Die Zugabe bis zu einem mehrfachen molaren Überschuß steigerte die Aktivität von  $E_N$  um ca. 50 %, hatte auf  $E_M$  aber wenig Einfluß. Dieses Ergebnis zeigt, daß die Inaktivität von  $E_M$  nicht auf  $\sigma$ -Mangel beruht.

| DNA                | Rif-<br>ampicin | zugegebene<br>RNA-Polymerase | $\beta$ -Galaktosidase<br>OD <sub>420</sub> |
|--------------------|-----------------|------------------------------|---------------------------------------------|
| $\lambda$ plac 5   | -               | -                            | 0.58                                        |
|                    | -               | E <sub>N</sub>               | 0.96                                        |
|                    | -               | E <sub>M</sub>               | 0.404                                       |
|                    | +               | -                            | 0.010                                       |
|                    | +               | E <sub>N</sub>               | 0.268                                       |
|                    | +               | E <sub>M</sub>               | 0.020                                       |
| $\lambda$ dtrp-lac | -               | E <sub>N</sub>               | 0.277                                       |
|                    | -               | E <sub>M</sub>               | 0.227                                       |
|                    | +               | E <sub>N</sub>               | 0.157                                       |
|                    | +               | E <sub>M</sub>               | 0.040                                       |

Tab. 10 Aktivität von E<sub>N</sub> und E<sub>M</sub> an verschiedenen Operons

Die Rifampicin-resistenten RNA-Polymerasen wurden in sättigenden Mengen zugegeben (E<sub>N</sub> = 157 µg; E<sub>M</sub> = 182 µg je 0.5 ml Ansatz). Der Synthese-Ansatz ist unter Material und Methoden beschrieben. Die Testzeit für den  $\beta$ -Galaktosidase-Nachweis betrug 60 min für  $\lambda$  plac 5 DNA und 260 min für  $\lambda$  dtrp-lac DNA.

Die Transkription des  $\beta$ -Galaktosidasegens an  $\lambda$  plac 5 DNA erfolgt zu gleichen Teilen von einem  $\lambda$ - und dem transduzierten E.coli-Promotor aus. Da nur die vom bakteriellen Promotor ausgehende Transkription mit cAMP stimulierbar ist, sind sie unterscheidbar. Die Inaktivität von E<sub>M</sub> an  $\lambda$  plac 5 DNA zeigt sich an beiden Promotoren.

Zum Studium der Transkription des Tryptophan-Operons wurde  $\lambda$  dtrp-lac-DNA benutzt. In dieser DNA ist das z Gen für  $\beta$ -Galaktosidase mit der trp Promotor-Operator-Region fusioniert, so daß die Expression des z Gens unter der Kontrolle des trp Promotors steht (54). Da  $\beta$ -Galaktosidase ein einfach bestimmbares Enzym ist, kann im Gegensatz zum normalen trp System die Aktivität des trp Promotors

leicht gemessen werden. Wie bei allen anderen anabolischen Operons spricht er nicht auf cAMP an. Daher wurde bei  $\lambda$  dtrp-lac DNA-abhängigen in vitro-Synthesen cAMP weggelassen.  $E_M$  zeigt am trp Promotor eine im Vergleich zu  $E_N$  vierfach erniedrigte Expression des  $\beta$ -Galaktosidasegens (Tab. 10).

Als Beispiel für eine andere Klasse bakterieller Gene wurde das tRNA Transkript der DNA des transduzierenden Phagen  $\phi 80\text{psu}_{III}^+$  untersucht.

Die Synthese dieser metabolisch stabilen RNA wurde in einem S-100 (ein S-30, aus dem die Ribosomen abzentrifugiert wurden), der zum "processing" der  $\text{tRNA}^{\text{tyr}}$ -Vorläufer-Moleküle befähigt ist, in Gegenwart von 0.1 mM Isopentenylpyrophosphat analysiert (78, 79). Die RNA wurde mit 25  $\mu\text{Ci}$  ( $^3\text{H}$ )-UTP (22 Ci/mM) je 0.15 ml Synthese-Ansatz markiert und durch Phenolextraktion gereinigt. Die Abtrennung der 4-S tRNA von anderen radioaktiven Produkten erfolgte durch Elektrophorese in einem Polyacrylamid-Gel (78).

In der Synthese der  $\text{su}_{III}^+$  tRNA erwies sich  $E_M$  als nur 1/4 so aktiv wie  $E_N$ .

Die Ergebnisse dieses Abschnitts zeigen, daß bei Analyse einzelner bakterieller Genprodukte normale RNA-Polymerase sich 4 bis 25 Mal aktiver zeigt als T4-modifizierte RNA-Polymerase. Die folgenden Untersuchungen wurden unternommen, um zu klären, welche Polymerase-Untereinheit für diesen Rückgang der Fähigkeit, bakterielle Gene zu exprimieren, verantwortlich ist.

#### 4. Modifikation der RNA-Polymerase $\alpha$ -Untereinheit als negatives Kontrollelement der lac-Genexpression

Um herauszufinden, ob die Modifikation der  $\alpha$ -Untereinheiten oder möglicherweise andere, an der  $\beta'$ - und  $\beta$ -Untereinheit spät nach Infektion auftretende Änderungen (80, 57) die beobachteten Unterschiede in der Genexpression verursachen, wurden Rekonstitutionsversuche durchgeführt. Hierzu wurden neue Präparationen von  $E_N$  und  $E_M$  in ihre Untereinheiten aufgetrennt und in der ursprünglichen Zusammensetzung aber auch mit ausgetauschten oder gemischten  $\alpha$ -Untereinheiten rekonstituiert (s. Material und Methoden; Abb. 10; 81).

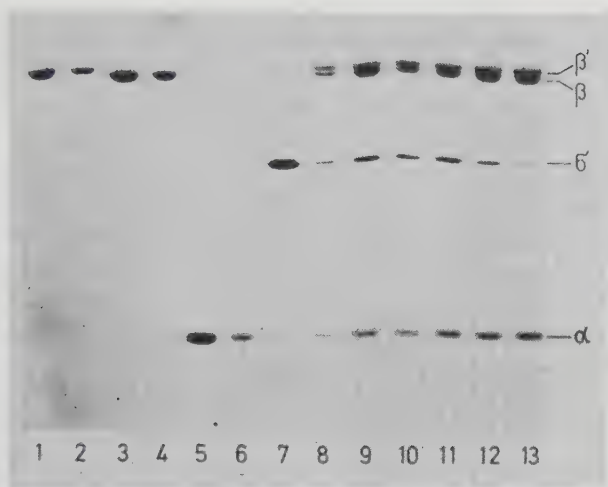


Abb. 10 SDS-Gel-Elektrophorese in einem 5-15 % linearen Polyacrylamid-Gradientengel

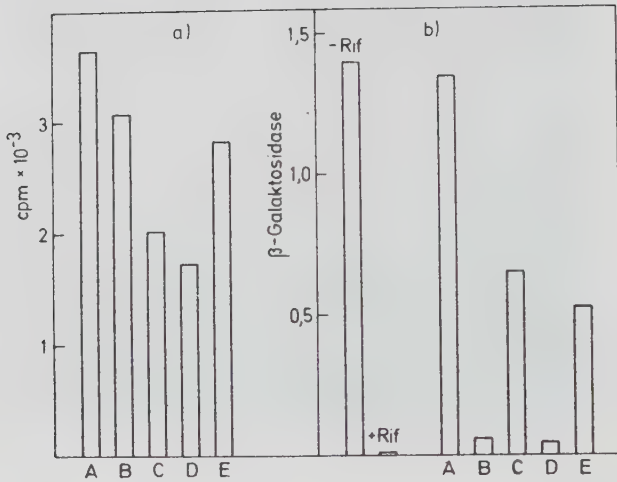
Aufgetrennt wurden die zur Rekonstitution verwendeten Rifampicin-resistenten RNA-Polymerasen  $E_N$  (12) und  $E_M$  (13), die daraus isolierten Untereinheiten sowie die aus diesen rekonstituierten Enzyme (8-11).

1 =  $\beta'_N$ ; 2 =  $\beta'_M$ ; 3 =  $\beta_N$ ; 4 =  $\beta_M$ ; 5 =  $\alpha_N$ ; 6 =  $\alpha_M$ ;

7 =  $\sigma_N$ ; 8 =  $\beta'_N \beta_N \alpha_{N_2} \sigma_N$  = rekonstituiertes  $E_N$ ;

9 =  $\beta'_N \beta_N \alpha_{M_2} \sigma_N$ ; 10 =  $\beta'_M \beta_M \alpha_{N_2} \sigma_N$ ; 11 =  $\beta'_M \beta_M \alpha_{M_2} \sigma_N$ .

Zur Bestimmung der Rekonstitutionsausbeute wurde die durch die rekonstituierten RNA-Polymerasen im reinen Transkriptionsansatz synthetisierte RNA als radioaktiv markiertes, Trichloressigsäure-fällbares Produkt bestimmt. Die Rekonstitutionsausbeute betrug demnach für  $E_N$  60 % und für  $E_M$  74 %. Normale rekonstituierte RNA-Polymerase zeigte wie das Ausgangsmaterial die höchste, modifizierte RNA-Polymerase, die niedrigste spezifische Aktivität.



**Abb. 11** Vergleich der rekonstituierten Polymerasen im RNA-Synthese Ansatz (a) und im  $\lambda$  plac 5 DNA-abhängigen System zur  $\beta$ -Galaktosidase Synthese (b).

$$\begin{aligned}
 A &= (\alpha_N)_2 \beta_N \beta' N \sigma_N = E_N; & B &= (\alpha_M)_2 \beta_N \beta' N \sigma_N; \\
 C &= (\alpha_N)_2 \beta_M \beta' M \sigma_N; & D &= (\alpha_M)_2 \beta_M \beta' M \sigma_N; \\
 E &= \alpha_N \alpha_M \beta_N \beta' N \sigma_N
 \end{aligned}$$

- a) 17  $\mu$ g der angegebenen RNA-Polymerase mit je 21 %  $\sigma$ -Anteil wurden mit Kalbsthymus-DNA im RNA-Synthese-Ansatz (s. Material und Methoden) eingesetzt.
- b) 28  $\mu$ g der identischen Enzym-Präparation wurden in Gegenwart von Rifampicin im Proteinsynthesystem verwendet. In keinem Fall war die Polymerasemenge im Überschuß, da die erzielte  $\beta$ -Galaktosidase-Synthese der eingesetzten RNA-Polymerase-Aktivität proportional war. Ohne Zugabe von RNA-Polymerase wird sowohl die Aktivität der endogenen Polymerase im zellfreien System erkennbar (-Rif), als auch deren Rifampicin-Hemmbarkeit (+Rif). Die Bedingungen für Synthese und Nachweis der  $\beta$ -Galaktosidase sind unter Material und Methoden angegeben. Die OD<sub>420</sub> nach 1 h  $\beta$ -Galaktosidasetest ist aufgetragen.

Gemischt rekonstituierte Enzyme zeigten intermediäre Werte (Abb. 11,a). Die spezifische Aktivität von  $E_M$  betrug 54 % derjenigen von  $E_N$ . Signifikante Spezifitätsunterschiede werden sichtbar, wenn Aliquote derselben rekonstituierten Enzyme im gekoppelten System mit  $\lambda$  plac 5 DNA in der Synthese von  $\beta$ -Galaktosidase verglichen werden (Abb. 11,b). Rekonstituierte normale RNA-Polymerase zeigt wieder die höchste Aktivität. Jedoch zeigen beide mit ausschließlich modifizierter  $\alpha$ -Untereinheit rekonstituierten Polymerasen eine um mehr als zehnfach erniedrigte Aktivität im  $\beta$ -Galaktosidase-Synthesystem. Dieses Ergebnis beweist, daß der Hauptunterschied zwischen  $E_N$  und  $E_M$  in der lac Genexpression auf  $\alpha_M$  zurückgeht.

Bisher war von den  $\alpha$ -Untereinheiten nur bekannt, daß sie neben  $\beta$ ,  $\beta'$  und  $\sigma$  zur Rekonstitution des katalytisch aktiven Holoenzym benötigt werden. Diese Versuche zeigen, daß die normale  $\alpha$ -Untereinheit für die Transkription des lac Operons essentiell ist. Durch Modifikation, d.h. ADP-Ribosylierung der  $\alpha$ -Untereinheiten, verliert E.coli die Fähigkeit zur Transkription dieses Operons. Die ADP-Ribosylierung der  $\alpha$ -Untereinheiten erweist sich an allen bisher geprüften Promotoren (lac, trp und  $su_{III}^+$  tRNA) generell als starke negative Kontrolle für E.coli Gene.

Wie schon ausgeführt (s. S. 41) beruhen die früher im einfachen RNA-Synthese-Ansatz an verschiedenen DNAs aus Bakteriophagen und Kalbsthymus gefundenen Unterschiede zwischen  $E_N$  und  $E_M$  auf einem  $\sigma$ -Mangel der modifizierten RNA-Polymerase. Nach Zugabe von  $\sigma$  verschwindet daher dieser Unterschied, womit gleichzeitig gezeigt ist, daß die Modifikation der  $\alpha$ -Untereinheiten die Fähigkeit des Enzyms, mit der  $\sigma$ -Untereinheit zu interagieren, nicht aufhebt. (70). Die Inaktivität von  $E_M$  am lac Operon ist allerdings keine Folge von  $\sigma$ -Mangel sondern beruht allein auf der ADP-Ribosylierung der  $\alpha$ -Untereinheiten: Wie Abb. 9 zeigt, kann sie nicht durch  $\sigma$ -Zugabe überwunden werden. Ebenso beruhen die Unterschiede zwischen den rekonstituierten Enzymen (Abb. 11,b) nicht auf der  $\sigma$ -Untereinheit, da alle Polymerasen gleiche, sättigende Anteile derselben  $\sigma$ -Präparation enthielten.

Berichte von T4-codierten  $\sigma$ -Faktoren in infizierten Zellen, die RNA-Polymerase zur Transkription mittlerer oder später T4 mRNA stimulieren (82, 57), sind nicht bestätigt worden. Andererseits wurde gezeigt, daß normales  $\sigma$  in T4-infizierten Zellen enthalten ist (13, 59). Daher wurde die verwendete  $\sigma$ -Untereinheit aus Rifampicin-resistenter normaler RNA-Polymerase präpariert (s. Material und Methoden). Abb. 12 zeigt die Aktivität der verwendeten  $\sigma$ -Präparation in der Stimulation von normalem Rifampicin-resistentem Minimalenzym. Im zellfreien System zur Synthese von  $\beta$ -Galaktosidase

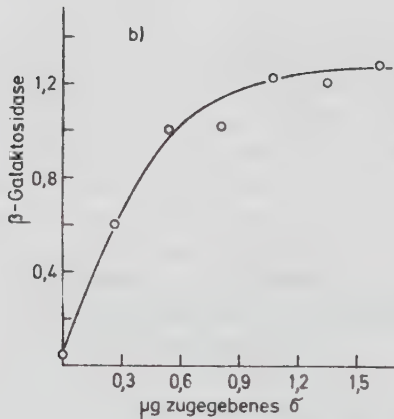


Abb. 12     $\sigma$  - Stimulationsverhalten

4  $\mu\text{g}$  Rifampicin-resistentes normales Minimalenzym wurde im zellfreien Proteinsynthesystem an  $\lambda$  plac 5 DNA in Gegenwart von Rifampicin mit steigenden Mengen an Initiationsfaktor  $\sigma$  behandelt. Die OD<sub>420</sub> nach 2 h  $\beta$ -Galaktosidasetest ist aufgetragen.

an  $\lambda$  plac 5 DNA in Gegenwart von Rifampicin ergibt sich eine Stimulationskurve, wie sie aus einfachen Ansätzen zur RNA-Synthese bekannt ist. Das Ergebnis zeigt nicht nur, daß der Einsatz von  $\sigma$  in der angegebenen Menge zur Stimulation von Minimalenzym völlig ausreichend war, sondern macht auch die Spezifität des gekoppelten in vitro-Transkriptions-Translations-Systems deutlich. Rifampicin-resistentes Minimalenzym ist darin ohne zugegebenes  $\sigma$  inaktiv. Offensichtlich steht ihm der  $\sigma$ -Faktor der endogenen, durch Rifampicin an der Initiation gehemmten RNA-Polymerase nicht zur Verfügung. Dies steht im Einklang mit Arbeiten, die zeigen, daß Freisetzung und Wiederverwendung der  $\sigma$ -Untereinheit erst nach Initiation der Transkription (d.h. nach dem Start der Nukleotidkette) stattfindet (83, 84).

Nach gegenwärtiger Auffassung geht der Initiation ein Aufschmelzen von Basenpaaren der DNA in der Promotor-Region voraus (93,89,99,85, 86,87). Dieses Aufschmelzen sollte durch Wechselwirkung zwischen RNA-Polymerase und Promotor erfolgen und daher sowohl von der Struktur der Polymerase als auch der Nukleotidsequenz des Promotors abhängen.

Das lokale Öffnen der DNA Basenpaare im Promotor sollte auf viele Einzeleinflüsse ansprechen (88). Wegen der Kooperativität dieses Übergangs haben schon kleine Änderungen in der Ionenstärke (89,90,91, 92), der Temperatur (93,89,94), der Zusammensetzung des Lösungsmittels (95,96), der Anwesenheit von DNA-Bindungsproteinen (97), der Verdrillung der DNA (98,99,100) und natürlich Änderungen der RNA-Polymerase (101,102,103) großen Einfluß auf die Lage des "Schmelzgleichgewichts". Daher könnten schon kleine Änderungen dieser Versuchsparameter einen starken Effekt auf die Initiation haben und einem An- und Abschalten von Genen gleichkommen. Die starke Diskriminierung zwischen  $E_N$  und  $E_M$  im zellfreien Proteinsynthesystem am lac Promotor könnte bei ADP-ribosylierten  $\alpha$ -Untereinheiten auf einer Gleichgewichtsverschiebung in Richtung auf "geschlossenen Komplex" beruhen. Der Einfluß von  $\alpha_M$ -Untereinheiten bei der Polymerase-Promotor-Interaktion wäre dann entweder in einer direkten Beteiligung der  $\alpha$ -Polypeptidketten bei der Wechselwirkung

mit der DNA oder mehr indirekt in der Induktion einer Konformationsänderung der RNA-Polymerase zu suchen. Diese könnte z.B. die Geschwindigkeit der DNA-Bindung und damit eventuell die Stärke des Promotors bestimmen (172). Durch die Modifikation der  $\alpha$ -Untereinheiten könnte aber auch die Wechselwirkung der Polymerase mit dem Initiationsfaktor  $\sigma$  geschwächt werden. Die Wirkung der Modifikation der RNA-Polymerase muß sich aber nicht unbedingt im Promotorbereich der DNA entfalten. Es besteht prinzipiell auch die Möglichkeit, daß sie die Elongation beeinflusst oder z.B. zu vorzeitiger Termination führt.

Falls sich die DNA des lysogenen Bakteriophagen  $\lambda$  wie das lac Operon verhielte, würde dies auch die beobachtete Inaktivität dieser Matrize für  $E_M$  erklären (Tab. 9). Die gegenüber  $\lambda$ -DNA starke Aktivität der DNA des lytischen Phagen T4, und zwar in für  $E_N$  und  $E_M$  fast identischer Weise (Tab. 9), ist am besten als Unterschied in der Promotorstärke verständlich. Es ist in der Tat bekannt, daß die Promotoren der T4-DNA eine relativ niedrige Übergangstemperatur der Bildung des stabilen RNA-Polymerase-DNA-Initiationskomplexes aufweisen (104). Dies könnte ein Ausdruck der Promotorstärke sein.

Die Inaktivität von  $E_M$  am lac Operon und seine volle Aktivität an T4-DNA weist auch darauf hin, daß die Promotoren des E.coli Gens und der T4-Gene unterschiedlich sind, und zwar derart, daß  $E_M$  an T4-DNA noch transkribieren kann. Die Promotoren dieses virulenten Phagen sind vermutlich stärker als die des E.coli-lac Operons, so daß sie auch von modifizierter RNA-Polymerase "genutzt" werden können.

##### 5. T4-DNA hemmt E.coli Genexpression in vitro

Dieser Unterschied zwischen T4-DNA einerseits und  $\lambda$ - oder E.coli-DNA (analysiert als transduzierter DNA-Abschnitt im  $\lambda$ -Phagen) andererseits, kommt auch in einem in Abb. 13 dargestellten Experiment zum Ausdruck. Es zeigte sich, daß die von  $\lambda$  plac 5 DNA (106  $\mu$ g/ml) abhängige Synthese von  $\beta$ -Galaktosidase im normalen zellfreien Proteinsynthesystem ohne Zusatz von Rifampicin und exogener RNA-

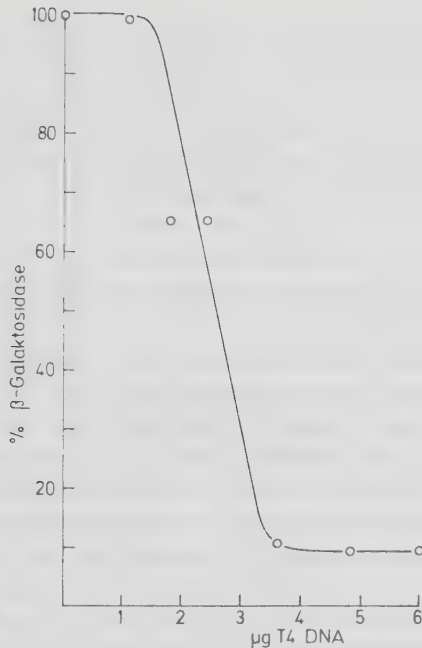


Abb. 13     $\lambda$  plac 5 DNA-abhängige  $\beta$ -Galaktosidase-Synthese als Funktion der zugegebenen Menge T4-DNA

Die in Abwesenheit von T4-DNA im zellfreien System synthetisierte  $\beta$ -Galaktosidase-Menge wurde gleich 100 % gesetzt. 53  $\mu$ g oder  $\lambda$  plac 5 DNA wurden in 0.5 ml Syntheseansatz eingesetzt. Weder Rifampicin noch zusätzliche Polymerase wurden zugegeben. Alle anderen Bedingungen s. Material und Methoden.

Polymerase durch T4-DNA fast vollständig gehemmt wird. Schon die geringe Menge von 7  $\mu$ g/ml T4-DNA im Ansatz bewirkt eine mehr als 90 %ige Hemmung. In Kontrolllexperimenten verursachten vergleichbare Mengen an  $\lambda$ -DNA keine Hemmung der  $\beta$ -Galaktosidase-Synthese. Dieser spezielle Hemmeffekt der T4-DNA, der auf der Stärke der T4-Promotoren beruhen könnte, spielt möglicherweise als Kompetition zwischen Phagen- und Wirts-DNA um einen Bestandteil der Transkriptionsmaschinerie unmittelbar nach Infektion von E.coli durch den Bakteriophagen eine Rolle. Als möglicher moi-abhängiger, Proteinsynthese-unabhängiger Mechanismus der Wirts-Genabschaltung soll er daher in Zusammenhang mit dieser diskutiert werden.

Eine T4-DNA-abhängige Hemmung der  $\beta$ -Galaktosidase-Synthese durch ein T4-Genprodukt ist in dem in Abb. 13 dargestellten Versuch nicht ausgeschlossen. Als Ursache der Wirts-RNA-Synthese-Abschaltung, die auch in Gegenwart von Chloramphenicol abläuft (105), kommt ein erst nach Infektion synthetisiertes T4-Protein natürlich nicht in Frage. Eine abhängig von T4-DNA synthetisierte RNA als Hemmstoff der Initiation der E.coli DNA-abhängigen RNA-Synthese ist nicht bekannt. Daher wird im Folgenden ein T4-Genprodukt als Ursache der raschen Chloramphenicol insensitiven Abschaltung nach T4-Infektion nicht weiter erörtert.

#### 6. ADP-Ribosylierung und DNA Konkurrenz als mögliche Mechanismen der Wirts-Genabschaltung

T2, T4 und T6 gehören zu den wenigen Bakteriophagen, die unmittelbar nach Infektion die Wirts-Genaktivität fast völlig abschalten. Ein Verständnis dieser Abschaltmechanismen sollte helfen, die extreme Virulenz dieser Phagen zu verstehen. Sofort nach Infektion stoppt die Initiation der E.coli mRNA, während die Elongation schon gestarteter mRNA Moleküle weiterläuft (106,107). Innerhalb einer Minute kommt es zu einem fast völligen Abschalten der E.coli-Transkription, während T4-DNA-abhängige Transkription in starkem Maße einsetzt (107,70). Eine Minute nach Infektion liegt bereits der größte Teil der Wirts-RNA-Polymerase in einem Komplex mit T4-DNA vor (108).

Trotz dem sofort nach Infektion erfolgenden Absinken des Gehalts an E.coli mRNA in infizierten Zellen (109), erfolgt 3-5 min nach T4-Infektion noch immer geringe Wirts-DNA-abhängige mRNA-Synthese, die möglicherweise auf der Elongation schon vor der Infektion initiiert RNA-Ketten beruht (110). Zur vollen Abschaltung von E.coli- oder  $\lambda$ -mRNA-Synthese ist T4-spezifische Proteinsynthese nötig (111). Chloramphenicol bietet Schutz vor einer völligen Abschaltung (112,70), vor allem der Wirts-rRNA (32) und tRNA-Gene (113), obwohl auch die mRNA-Synthese an E.coli-DNA nicht ganz gestoppt ist (105,112). Der Hauptteil der mRNA in T4-infizierten Zellen unter diesen Bedingungen ist aber T4-mRNA (114,115,70).

Die Unterscheidung zweier Abschaltmechanismen ist möglich (105):

In Gegenwart von CAM führt T4-Infektion zu einem nicht vollständigen Abschalten der Wirts-RNA-Synthese. Aber je höher die verwendete *moi* an Phagen, desto stärker ist der Abschalteffekt. Als Ursache für diesen *moi*-abhängigen Mechanismus könnte, wie beschrieben, die Konkurrenz der injizierten Phagen-DNA mit der *E.coli*-DNA um die Wirts-RNA-Polymerase dienen. Das in Abb. 13 dargestellte Experiment würde dann die Verhältnisse in der T4-infizierten *E.coli*-Zelle simulieren. Zusätzlich könnte jedes von der injizierten Alterationstransferase als Substrat verwendete Protein in seiner ADP-ribosylierten Form an dieser Abschaltung beteiligt sein. Die T4-alterierte Wirts-RNA-Polymerase ist ein möglicher Kandidat für diese Funktion.

Zur Abschaltung der restlichen RNA-Synthese ist nach Infektion die Synthese eines T4-Genprodukts nötig (116). Als mittleres T4-Genprodukt (5) zeigt die Modifikations-ADP-Ribosyltransferase in infizierten *E.coli*-Zellen erst 4 min nach Infektion (30°C) ihr Aktivitätsmaximum (33). Entsprechend beginnt modifizierte RNA-Polymerase 2-3 min nach Infektion zu erscheinen (2,5). Als Ursache der endgültigen Abschaltung der noch 4 min (30°C) nach T4-Infektion nicht unbeträchtlichen restlichen Wirts-RNA-Synthese (112,110) ist die T4-induzierte Modifikation der Wirts-RNA-Polymerase nicht auszuschließen.

Andere Arbeiten (70) zeigen zu dieser Zeit nach Infektion ein geringeres Ausmaß Wirts-DNA-abhängiger RNA-Synthese auf, allerdings stößt die Abschätzung von RNA-Syntheseraten in Pulsmarkierungsexperimenten ohne gleichzeitige Kenntnis der Kinetik der Markierung der Nukleotidpools auf Schwierigkeiten (113).

Die verringerte Ablesung der rRNA-Gene nach T4-Infektion unter CAM könnte die Konkurrenz von T4-DNA um die Wirts-RNA-Polymerase widerspiegeln, da bei einer *moi* von 8 die injizierte Phagen-DNA schon ca. 30 % der Menge an Wirts-DNA in der Zelle ausmacht (32).

Horvitz hat die Wirts-rRNA-Synthese unter Chloramphenicol nach Infektion durch T4  $alt^-$ , T4  $mod^-$  und T4<sup>+</sup> gemessen. Unter den

gewählten Versuchsbedingungen hat jegliche ADP-Ribosylierung durch Alterationstransferase keinen Einfluß auf das Ausmaß restlicher Wirts-rRNA-Synthese (32).

Die nach T4 mod<sup>-</sup> Infektion beobachtete Abschaltung der rRNA-Synthese schließt einen normalerweise vorhandenen Einfluß modifizierter RNA-Polymerase auf diesen Abschaltmechanismus nicht aus. Wegen der langen Versuchszeit (4-12 min nach T4-Infektion) können hemmende Einflüsse, durch T4-codierte Nucleasen, welche die Wirts-DNA abbauen, auf die rRNA-Synthese nicht vernachlässigt werden. Da die Auswirkungen der Modifikation der RNA-Polymerase promotor-spezifisch sind, muß ihr Einfluß auf die Transkriptions-abschaltung der E.coli rRNA-Gene eigens geprüft werden.

Im Folgenden wird ein hypothetisches Modell der Wirts-Transkriptionsabschaltung nach T4-Infektion dargestellt. Unter Berücksichtigung der eigenen Ergebnisse wie auch der Literaturdaten beschreibt es sowohl die schnelle, nicht Proteinsynthese-, jedoch moi-abhängige (a), als auch die langsame, an Phagenexpression gebundene Komponente der Wirts-RNA-Synthese-Abschaltung (b).

- a) Nach Injektion der T4-DNA terminieren die RNA-Polymerase-Moleküle je nach Länge ihrer Transkripte an E.coli-DNA zu verschiedenen Zeiten. Wegen der Stärke der Promotoren der T4-DNA initiiert frei werdende Polymerase bevorzugt an T4-DNA. Die Annahme, daß an E.coli DNA mRNA Promotoren schwächer sind (oder stärker reprimiert sind) als solche für rRNA und tRNA, erklärt den Stop der Initiation der mRNA und die stark reduzierte Initiation von RNA-Ketten an E.coli-Promotoren für stabile RNA. Dies führt zum Abschalten der Wirts- und zum Anschalten der T4-Proteinsynthese.
- b) Die Modifikationstransferase führt als mittleres T4-Genprodukt zu ADP-ribosylierter RNA-Polymerase. Diese ist gegenüber E.coli Promotoren inaktiv (lac Operon) bis schwach aktiv (tRNA-Gen), arbeitet aber gut an T4-DNA. Dies führt zu einer weiteren Reduktion der Wirts-Genexpression. Schließlich bauen T4-codierte Nucleasen das Wirtsgenom ab.

T4-Infektion unter CAM verhindert Modifikation, erlaubt aber DNA-Kompetition nach (a). Wirts-mRNA-Synthese ist stark reduziert, T4-mRNA-Synthese erfolgt. Zur Synthese stabiler Wirts-RNA kommt es nur noch auf reduziertem Niveau.

Die Abschaltung aller makromolekularen Synthesen durch Phagen-ghosts, die fast immer eine geplatzte Kopfmembran haben, könnte auf einem Auslaufen der gegenüber dem Medium unter hohem osmotischem Druck stehenden Zelle durch den Phagen-Injektionskanal beruhen. Da keine T4-DNA injiziert wird, und damit reparierende Phagengene fehlen, kommt es zum bekannten Verlust aller niedermolekularen phosphathaltigen Moleküle und damit zum Stop aller Synthesen.

Aus der Rifampicin-Sensitivität des T4-Transkriptionsprogramms während der gesamten T4-Entwicklung wird deutlich, daß der Phage für seine Transkription ausschließlich das Grundgerüst der Wirts-RNA-Polymerase verwendet (117,118). Da Alteration und Modifikation der Wirts-RNA-Polymerase mit der Abschaltung der Wirtstranskription und dem schrittweisen Anschalten des Transkriptionsprogramms des T4-Phagen nicht nur parallel gehen, sondern möglicherweise in ursächlichem Zusammenhang stehen, sei der Ablauf der T4-Genexpression im Folgenden geschildert.

## 7. Regulation der T4-Genexpression

An der T4-DNA beginnt unmittelbar nach deren Injektion die Transkription der frühen Gene, die ca. die Hälfte aller T4-Gene umfassen und zu mehr als 99 % vom 1-Strang der T4-DNA codiert sind (119,120). Der Synthese der frühen mRNA folgt nach einem Wechsel in der Transkriptionsspezifität innerhalb der ersten Minuten nach Infektion die Synthese von mittlerer mRNA (121), deren Gene Promotor-distal von denen der frühen mRNA liegen und offenbar durch Elongation der frühen mRNA-Moleküle transkribiert werden (122,123). Wird allerdings dem Medium eine Minute nach T4-Infektion Rifampicin, ein Hemmstoff der Initiation der RNA-Synthese, zugesetzt, so bleibt eine kleine Gruppe mittlerer Proteine aus (124,125,126) oder wird quantitativ vermindert (125,127). Dies ist ein Hinweis darauf, daß neben der Elongation auch Initiation bei der Synthese mittlerer mRNA-Ketten beteiligt ist. Eine T4-Mutante mit der Bezeichnung *mot* verzögert die Synthese all der frühen T4-Proteine, deren Synthese qualitativ oder quantitativ von der Initiation mittlerer mRNA abhängt (128). Erfolgt die T4-Infektion in Gegenwart von Chloramphenicol, so wird ebenfalls das Auftreten vieler mittlerer Promotor-distaler mRNAs blockiert, aber nicht mehr, wenn Chloramphenicol erst 2-3 min (30°C) nach Infektion gegeben wird (121, 123,122). Dieser Effekt könnte auf einer CAM-induzierten Transkriptionspolarität beruhen, wie sie von Bakterien bekannt ist (75,129,130,131,132). Alternativ könnte er durch das Fehlen eines Proteins zustande kommen, das in vivo beim Umschalten von frühen auf mittlere Gene eine Rolle spielt. In diesem Zusammenhang wird vor allem die mögliche Initiation an Promotoren, die zwischen diesen beiden Genklassen liegen, diskutiert (133,125,124,127). Andererseits

ist auch die Aufhebung von Terminationsorten zwischen den beiden denkbar (35). Eine mögliche Parallele könnte hier die Wirkungsweise des N-Genprodukts beim Bakteriophagen  $\lambda$  sein (134,135,136).

Der Effektor dieses Wechsels der T4-Transkriptionsspezifität scheint diffusibel zu sein (137). Da er nach T4-Infektion auch in Gegenwart von aminosäureanalogen Verbindungen, die die Synthese funktionsfähiger Proteine verhindern, seine Funktion zeigt (138), kann die Beteiligung einer präformierten Wirtskomponente nicht ausgeschlossen werden (35).

Bereits früh nach Infektion wird eine RNA-Klasse unbekannter Funktion vom T4 l-Strang transkribiert, die zur späten T4-RNA, welche praktisch nur vom r-Strang abgelesen wird, komplementär ist (139,120). Die Transkription der späten T4-mRNA ist vom Vorliegen der T4-DNA im Replikationszustand abhängig. Späte T4-mRNA wird aber erst 10 min nach Infektion synthetisiert, während die Replikation der T4-DNA schon sieben Minuten nach Infektion (30°C) einsetzt. Ferner ist die Synthese dieser RNA von der Expression der T4-Gene 33 und 55 abhängig (140,141,142,143). Von den vier Peptiden, die spät nach T4-Infektion an die modifizierte RNA-Polymerase gebunden sind und bei deren Reinigung mitisoliert werden (144,59,60), konnten zwei als Produkte der Gene 33 (ein Protein von 12.000 Dalton) und 55 (ein Protein von 22.000 Dalton) identifiziert werden (144,59,145,146). Das Gen 33-Produkt und die  $\sigma$ -Untereinheit scheinen um dieselbe Bindungsstelle an Minimalenzym zu kompetieren (147). Ein weiteres T4-Protein von 29.000 Dalton Molekulargewicht, das Produkt des T4-Gens 45, interagiert mit modifiziertem Minimalenzym in vivo. Bei Reinigung der RNA-Polymerase wird es aber nicht mit dem Enzym angereichert (148,147,149,150,172,173).

Im Gegensatz zum Bakteriophagen T7, der 80 % seines Genoms mit einer eigenen RNA-Polymerase transkribiert, verwendet der Phage T4 (wie auch die meisten *Bacillus subtilis*-Phagen (151)) für sein gesamtes genetisches Programm die Wirts-RNA-Polymerase, wenn auch in veränderter Form. Neben der geschilderten negativen Kontrolle der Wirtstranskription könnte die ADP-Ribosylierung der beiden

$\alpha$ -Untereinheiten auch eine positive Regulation in der Steuerung der T4-Genexpression bewirken.  $E_M$  allein kann in vitro an T4-DNA die mittleren Gene nicht transkribieren (Abb. 8). Daher ist, wie bei der späten T4-Transkription verwirklicht, auch schon bei Expression der mittleren Gene an eine Beteiligung von zusätzlichen Phagen- oder Wirtsproteinen zu denken. Ein Hinweis hierauf ist das Auftauchen "nicht früher" T4-Proteine, wenn  $E_M$ , nicht aber  $E_N$ , im gekoppelten zellfreien Proteinsynthese-System an T4-DNA mit einer Proteinfraction, welche spät aus T4-infizierten Zellen isoliert wurde, versetzt wird (152). Ob der Unterschied zwischen  $E_N$  und  $E_M$  an E.coli Promotoren im zellfreien System schon eine Eigenschaft der RNA-Polymerase selbst ist, oder auf der Wechselwirkung mit einem E.coli-Protein aus dem Extrakt beruht, kann erst durch weitere Experimente geklärt werden.

## 8. Biologischer Sinn der Alteration

Die Schnelligkeit der Alteration und ihre Unabhängigkeit von Proteinsynthese (2) beruht, wie gezeigt wurde, auf der Injektion einer  $NAD^+$ :Protein-ADP-Ribosyltransferase des T4-Phagen. Wegen der geringen Substratspezifität der Alterationstransferase ist nicht klar, ob die beobachtete ADP-Ribosylierung von Wirts-RNA-Polymerase-Untereinheiten (12,13,5,14) oder die anderer Wirtsproteine die Hauptaufgabe der Alterationstransferase in der infizierten E.coli-Zelle darstellt. Obwohl die  $\sigma$ -Untereinheit nach T4-Infektion weder abgebaut noch inaktiviert wird (59,60,13,5), zeigt isoliertes  $E_A$ , allerdings nicht so drastisch wie  $E_M$ , je nach Aufarbeitungsmethode relativ zu  $E_N$  einen  $\sigma$ -Mangel.

Dieser erklärt die beschriebenen Unterschiede zwischen normaler und alterierter RNA-Polymerase (68,2), die auf eine verlangsamte Initiationsgeschwindigkeit zurückgeführt wurden (69). Wegen der zeitlichen Koinzidenz sind Einflüsse der injizierten ADP-Ribosyltransferase auf Membranänderungen, oder den Stop der Wirts-DNA- oder RNA-Synthese nach T4-Infektion nicht ausgeschlossen. Da die T4  $alt^-$  Mutante mindestens noch zwei andere mutierte Gene trägt, kann die Restriktion von T4  $alt^-$  durch drei verschiedene E.coli-Stämme nicht eindeutig auf die fehlende ADP-Ribosyltransferase zurückgeführt werden (32).

## 9. Alteration und Modifikation unter der Kontrolle nicht essentieller Phagengene

Etwa 32, das sind etwas mehr als ein Drittel aller vom Bakteriophagen T4 bekannten Gene, sind nicht essentiell (153). Einige von diesen liegen in großen deletierbaren Abschnitten, die wahrscheinlich weitere nicht-essentielle Gene der ca. insgesamt 120 T4-Gene enthalten (154,155,156,157). Daß sowohl Alteration als auch Modifikation nicht essentiell sind, wurde durch das Auffinden sowohl eines T4  $\text{alt}^-$  Phagen, dem die Alterationstransferase fehlt, der aber noch modifizieren kann, als auch eines T4  $\text{mod}^-$  Phagen, der noch alterieren, aber nicht mehr modifizieren kann, gezeigt (32). Da nun aber, wie in dieser Arbeit gezeigt, sowohl Alteration als auch Modifikation unabhängig von einander zu einer ADP-Ribosylierung der RNA-Polymerase  $\alpha$ -Untereinheiten führen, kann erst die Charakterisierung einer T4  $\text{alt}^-$  und  $\text{mod}^-$  Doppelmutante beweisen, daß die ADP-Ribosylierung von Wirtsproteinen für den Phagen nicht essentiell ist.

Von den 32 nicht essentiellen T4-Genen sind mehr als die Hälfte direkt am Nukleinsäurestoffwechsel beteiligt, indem sie vorhandene Zellaktivitäten verstärken oder ersetzen. So sind z.B. bei T4 in einem DNA-Abschnitt 8 verschiedene tRNAs codiert (165, 158). Die Deletion dieser gesamten tRNA Region führt noch zu lebensfähigen Phagen, wenn auch mit verringerter Wurfgröße (165, 159,160). Andererseits ist eine dieser tRNAs für die Phagenvermehrung auf einem bestimmten E.coli-Wildstamm essentiell (161). Die Folgen des Verlustes nicht-essentieller Gene für den Phagen sind also eine Verkleinerung von Wurfgröße oder Wirtsbereich. Optimal angepaßt zu sein für die Auseinandersetzung mit dem Wirt bedeutet für ein Virus eben nicht nur die notwendige minimale Enzymausstattung zu besitzen.

Fehlende einfache Selektions- und Testmöglichkeiten für nicht-essentielle Gene erschweren ihre genetische und biochemische Analyse.

## 10. Zusammenfassung von Kapitel III

Bei sättigendem Anteil der Untereinheit  $\sigma$  zeigt sich zwischen normaler und modifizierter RNA-Polymerase im einfachen RNA-Synthese-Ansatz kein Aktivitätsunterschied.

Der Ersatz der Rifampicin gehemmten RNA-Polymerase eines zellfreien Proteinsynthesesystems, in welchem Transkription und Translation gekoppelt ablaufen, durch zugegebene Rifampicin-resistente RNA-Polymerasen, erlaubt es, Spezifitätsunterschiede zwischen normalem und modifiziertem Enzym zu erkennen. Mit dieser neuen Methode wurde gezeigt, daß die ADP-Ribosylierung der RNA-Polymerase ihre Fähigkeit zur in vitro-Expression verschiedener E.coli-Gene stark einschränkt. Die Inaktivität von modifizierter RNA-Polymerase im zellfreien System an E.coli-Genen beruht nicht, wie die normalen Minimalenzym, auf einem Mangel an  $\sigma$ .

Es handelt sich um einen prinzipiell neuen Mechanismus der Transkriptionskontrolle. Im Gegensatz zur Änderung der Transkriptionsspezifität durch Bindung von Proteinen (Aktivatoren, Repressoren) an Signalstellen der DNA beruht er auf einer Änderung der Transkriptionsspezifität durch strukturelle Modifikation der RNA-Polymerase selbst. Diese Veränderung an den RNA-Polymerase  $\alpha$ -Untereinheiten wirkt an verschiedenen DNAs unterschiedlich. Sie stellt eine starke negative Kontrolle der E.coli und  $\lambda$ -, nicht aber der T4-Genexpression dar.

Hierin und in dem starken Hemmeffekt, den T4-DNA schon in geringer Menge auf die in vitro Expression des E.coli lac Operons hat, kommt offenbar die unterschiedliche Stärke von E.coli- und T4-DNA Promotoren zum Ausdruck. Der Einfluß von DNA-Kompetition und ADP-Ribosylierung auf die T4-infizierte E.coli-Zelle wird in einem Modell der Abschaltung der Wirts-Genexpression diskutiert.

Normale und modifizierte RNA-Polymerase exprimiert an T4-DNA in vitro im gekoppelten System die gleichen Genprodukte. Aber nur

modifizierte RNA-Polymerase führt zusammen mit einer Proteinfraktion aus T4-infizierten Zellen zur in vitro Synthese "nicht früher" T4-Proteine.

Diese mögliche positive Regulationsfunktion der ADP-Ribosylierung der RNA-Polymerase  $\alpha$ -Untereinheiten wird ebenso diskutiert wie die Codierung von Alterations- und Modifikationstransferase durch nicht essentielle Gene.

## C. MATERIAL UND METHODEN

### I. Material

#### 1. Substanzen

Radioaktive Ribonukleosidtriphosphate, markierte Aminosäuren, markiertes  $\text{NAD}^{\oplus}$  und Protosol wurden von NEN Chemicals, Dreieichenhain, geliefert. Radioaktives Phosphat lieferte Amer-sham-Buchler. Folinsäure, UTP, CTP, ATP, DEAE-Cellulose und Cellogelstreifen wurden von Serva, Heidelberg, bezogen. Die Firma Merck, Darmstadt, lieferte Pepton aus Casein, Proteinase K, Pronase E, Coomassie-Brillanthblau, 2-Nitrophenyl- $\beta$ -galactopyranosid, Cellulose-Dünnschichtplatten und alle Salze. Flavin-adenindinukleotid,  $\beta$ -Nicotinamid-adenin-dinukleotid,  $\beta$ -Nicotinamid-adenin-dinukleotidphosphat, Phosphoenolpyruvat, Ribose-5-Phosphat, Adenosin-3':5'-monophosphorsäure (cyclisch), Transfer-Ribonukleinsäure aus E.coli, Phosphodiesterase aus Crotalus, Pyruvat-Kinase aus Kaninchenmuskel (Kristallsuspension) und Lysozym wurden von Boehringer, Mannheim, bezogen. Sigma Chemical Company, St. Louis, lieferte Deoxyribonuklease-1, Adenosin-5'-diphosphoribose, GTP,  $\text{NAD}^{\oplus}$  Nukleosidasen (N 9626, 9754, 9879), Nukleotid Pyrophosphatase (P 7383) und Kalbsthymus-DNA. Alkalische Phosphomonoesterase aus E.coli (BAPC) und Phosphodiesterase I aus C.adamanteus (VPH OCA, VPH 107) wurden von Worthington bezogen. Membranfilter von Sartorius, Göttingen, PC-Cellulose der Fa. Whatman von Hormut & Vetter, Hefeextrakt von Oxoid, London, und Bacto-Agar von Difco Laboratories, Detroit. Cronex 2 Röntgenfilm zur Autoradiographie stammte von du Pont, MN 2214 Papier zur Hochspannungselektrophorese von Macherey & Nagel. Polymin P war ein Geschenk der BASF, Ludwigshafen.

#### 2. Bakterienmedien

A) Normalmedium (modifiziert nach Fraser & Jerrel (162))

10 g Pepton, 50 ml Fraser, 5 g Glucose, 30 ml Phosphatlösung,

$\text{H}_2\text{O}$  ad 1 l.

Fraser: 2.5 l Glycerin, 3.3 g  $\text{CaCl}_2$ , 1 g Gelatine, 100 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,

30 g  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  ad 5 l.

Phosphatlösung: 1.500 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 575 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  ad 5 l.

Phosphat- und Glucoselösung wurden separat sterilisiert.

B) Vollmedium

Zusammensetzung wie bei Normalmedium (A) aber zusätzlich 15 g Hefeextrakt und 0.7 g Natriumhydroxid je Liter Medium (pH 7.3).

C) Phosphatarmes Medium

12.1 g Tris, 0.033 g  $\text{CaCl}_2$ , 1.0 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0.3 g  $\text{MgSO}_4$ , je 1 g Alanin, Glutamin, Glycin, Tryptophan, 5 g Glucose, 25 ml Glycerin,  $\text{H}_2\text{O}$  ad 1 l, pH 7.5 (HCl). - Nach dem Sterilisieren wurde durch Zugabe von 2 ml einer 0.1 M Phosphatstammlösung (13.15 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 5.05 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  ad 1 l) eine Phosphatkonzentration von 0.2 mM eingestellt.

D) Kulturmedium für Bakterien zur Herstellung des zellfreien Proteinsynthesesystems

5.6 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (anhydr.), 28.9 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (anhydr.), 10 g Hefeextrakt, 0.015 g Thiamin,  $\text{H}_2\text{O}$  ad 1 l, 40 ml 25 % Glucoselösung wurden nach dem Sterilisieren zugegeben.

E) Medium zur Kultur lysogener Bakterien

10 g Trypton (Difco), 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl, 100 ml 1 M Tris-HCl, pH 7.3,  $\text{H}_2\text{O}$  ad 1 l.

Plattenagar

10 g Pepton, 15 g Agar, 5 g NaCl,  $\text{H}_2\text{O}$  ad 1 l, 40 min sterilisieren, anschließend wurde 6 ml 1 n NaOH zugegeben.

Deckagar

1 g Pepton, 0.7 g Agar, 0.5 g NaCl,  $\text{H}_2\text{O}$  ad 0.1 l.

3. Puffer und andere Lösungen

TA Puffer

0.05 M Tris-Acetat, pH 7.5, 0.022 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0.25 mM EDTA, 0.01 M  $\beta$ -Mercaptoäthanol, 10 % Glycerin.

#### Boratpuffer zur Cellogel-Elektrophorese

0.6 M Borsäure-NH<sub>4</sub>OH, pH 8.9, 6 M Harnstoff, 0.02 M  $\beta$ -Mercapto-  
äthanol, 0.01 M EDTA.

#### Phagen-Verdünnungspuffer

0.01 M Tris-HCl, pH 7.6, 1 mM EDTA, 0.85 % NaCl.

#### Rekonstitutionspuffer

0.05 M Tris-Acetat, pH 7.9, 0.2 M KCl, 0.01 M Mg(OAc)<sub>2</sub>, 1 mM  
EDTA, 0.02 M  $\beta$ -Mercaptoäthanol.

#### Bicarbonatpuffer

0.15 M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>-Acetat, pH 9.0, 6 M Harnstoff, 0.01 M Mg(OAc)<sub>2</sub>,  
1 mM EDTA, 0.02 M  $\beta$ -Mercaptoäthanol, 5 % Glycerin.

#### Puffer zur Bakterienlyse

- A) 0.01 M Tris-HCl, pH 8.1, 0.01 M NaN<sub>3</sub>, 0.1 M NaCl, 20 % Rohrzucker
- B) 0.12 M Tris-HCl, pH 8.1, 0.05 M EDTA, 4 mg/ml Lysozym
- C) 1 % Brij 58, 0.4 % Na-Desoxycholat, 0.1 M NaCl, 0.01 M EDTA

#### Färbebad für Polyacrylamidgel

2.2 g Coomassie-Brillantblau, 400 ml H<sub>2</sub>O, 400 ml Methanol, 80 ml  
Eisessig.

#### Färbebad für Cellogel

1 g Amidoschwarz, 400 ml Cellogel Entfärbelösung.

#### Cellogel Entfärbelösung

4.5 l Methanol, 4.5 l H<sub>2</sub>O, 1 l Eisessig.

#### Dioxan-(Bray-)Szintillator

4 g 2,5-Diphenyloxazol (PPO), 0.2 g p-bis-2-(4-Methyl-5-Phenyl-  
oxazolyl)-Benzol (POPOP), 60 g Naphthalin, 100 ml Methanol,  
20 ml Äthylenglykol, Dioxan ad 1 l.

#### Toluol-Szintillator

4 g PPO, 0.3 g POPOP, Toluol ad 1 l.

### Indikatorspray für reduzierende Zucker

Sprühlösung: 0.93 g Anilin und 1.66 g o-Phthalsäure wurden in 100 ml wassergesättigtem n-Butanol gelöst. Nachbehandlung: 10 min auf 105°C erwärmen (163).

## 4. Organismen

Die Phagenstämme T4 amN120 (Gen 27) und T4 amB17-amN120 (Gen 23, 27) stammen von E.P. Geiduschek, San Diego, T4 amH11 (Gen 23), T4<sup>+</sup>, T4 D osmotisch sensitiv, und T4 amN82 (Gen 44) sind aus der Sammlung Hofschneider, Martinsried. T4 HA100-HA9-HA35 (= T4 "IP<sup>0</sup>") und T4 HA35 (= T4 IP<sub>I</sub><sup>-</sup>) wurden von L. Black zur Verfügung gestellt. Der Phage  $\phi$ 8Opsu<sub>III</sub><sup>+</sup> stammt von M.L. Gefter, Boston.

Die E.coli-Stämme B und CR63 (su<sub>I</sub><sup>+</sup>) sind aus der Sammlung Hofschneider; AJ7 (rif-r) stammt von D. Boyd. E.coli LG4 und der für  $\lambda$  plac 5 lysogene Stamm wurden von G. Zubay (New York) zur Verfügung gestellt. E.coli BF266 wurde von P. Primakoff (Pasadena) bezogen.

## II. Methoden

### 1. Analytische Methoden

#### a) Test der RNA-Synthese

Es wurde der Einbau von radioaktivem Ribonukleosidtriphosphat in säureunlösliches Material gemessen. Die Reaktionsansätze enthielten in 0.25 ml: 50 µg DNA; 5-10 µg RNA-Polymerase, 25 µg Rinderserumalbumin; 4 µg Pyruvatkinase je 0.25 µMol der Ribonukleosidtriphosphate (eines der Ribonukleosidtriphosphate war radioaktiv markiert - spezifische Aktivität 0.1 Ci/Mol); 2.5 µMol Phosphoenolpyruvat; 7.5 µMol Tris; 7.5 µMol Mg(OAc)<sub>2</sub>; 30 µMol NH<sub>4</sub>Cl, pH 7.9 (NH<sub>4</sub>OH). Der Normalansatz wurde 10 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 2 ml Eiswasser und 2 ml 10 %iger TCA gestoppt. Der gesamte Ansatz wurde über Membranfilter filtriert und dreimal mit kalter 5 %iger TCA ge-

waschen. Nach dem Trocknen wurde die Radioaktivität der Filter gemessen.

#### b) Elektrophoretische Trennmethoden

Die analytische oder präparative Auftrennung der RNA-Polymerase in ihre Untereinheiten durch Elektrophorese auf Celluloseacetat-Gelen erfolgte wie beschrieben (81). Um Untereinheiten für die Rekonstitution enzymatisch aktiver RNA-Polymerase zu gewinnen, erfolgte die Auftrennung in Bicarbonatpuffer. In allen anderen Fällen wurde in Boratpuffer gearbeitet.

SDS-Polyacrylamid-Plattengele wurden nach Laemmli (23) hergestellt. Gradienten-Gele (5-20 % Acrylamid) wurden wie von Mirault und Scherrer (164) beschrieben gegossen.

Um den Anteil ADP-ribosylierter  $\alpha$ -Untereinheiten in RNA-Polymerase Immunpräzipitaten abzuschätzen, wurden diese in Harnstoff-Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Untergel: 0.375 M Tris-HCl, pH 8.8, 8 M Harnstoff, 5 % Acrylamid, 0.13 % bis-Acrylamid, 0.03 % Ammoniumpersulfat, 0.05 % Tetramethyläthylendiamin (TMED). Obergel: 0.125 M Tris-HCl, pH 6.8, 8 M Harnstoff, 3 % Acrylamid, 0.08 % bis-Acrylamid, 0.03 % Ammoniumpersulfat, 0.05 % TMED. Aufgetragen wurde eine Mischung aus 5  $\mu$ l Proteinlösung und 20  $\mu$ l Probenpuffer (8 M Harnstoff, 0.045 M  $\beta$ -Mercaptoäthanol, 0.01 % Bromphenolblau). Reservoir Puffer: 0.025 M Tris, 0.192 M Glycin, pH 8.3.

#### c) Bakterienlyse und Immunpräzipitation

$1.25 \cdot 10^{10}$  E.coli-Zellen wurden abzentrifugiert und mit 5 ml Puffer A gewaschen. Nach Suspension in 0.25 ml Puffer A (0°C) wurden die Zellen mit 0.065 ml Puffer B versetzt, nach 1 min mit 0.315 ml Puffer C homogen vermischt und 10 min bei 20°C inkubiert. Nach weiterer Zugabe von 0.04 ml 0.4 M  $MgCl_2$  und 0.06 ml DNase-Lösung (1 mg/ml) wurde 30 min bei 30°C weiter inkubiert. Nach Abzentrifugieren der Zelltrümmer (30 min, 48.000 g) wurde der Überstand mit 30 % Glycerin versetzt und durch Zugabe von 0.075 ml

Ziegen-Antiserum die RNA-Polymerase innerhalb 10 h bei 4°C präzipitiert. Nach dreimaligem Waschen des Präzipitats mit TA plus 20 % Glycerin wurde es in Laemmli-Puffer gelöst und im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt.

d) Radioaktivitätsbestimmung von Banden aus Polyacrylamidgelen

RNA- bzw. Proteinbanden wurden ausgeschnitten und in Szintillationsröhrchen mit 0.2 ml 30 %  $H_2O_2$  4 h bei 60°C inkubiert. Durch Zugabe von 0.2 ml "Protosol" erfolgte in weiteren 4 h bei 60°C die Auflösung der Gelstückchen. Nach Auffüllen mit 10 ml Kinards Szintillator wurde gemischt, 5 h bei 4°C stehen gelassen, und dann die cpm bestimmt. Jeweils der  $\beta'$ -Bereich des mit Coomassie-Brillantblau gefärbten SDS-Polyacrylamidgels wurde ausgeschnitten und bei 50°C in 12 h in 2 ml 5 %iger SDS-Lösung die blaue Farbe herausgelöst. Durch Quantifizierung bei 590 nm konnten die Korrekturfaktoren zu der in der  $\alpha$ -Bande enthaltenen Radioaktivität bestimmt werden.

e) Phosphatbestimmung

0.05-0.20 ml der zu bestimmenden Lösung wurden mit 0.10 ml Schwefelsäure (3 Teile Wasser, 1 Teil konz.  $H_2SO_4$ ; v:v) über freier Flamme erhitzt bis  $SO_3$ -Dämpfe entweichen. Nach dem Abkühlen wurde entstandene Kohle durch Zusatz eines Tropfens Perhydrol durch erneutes Erhitzen über freier Flamme oxidiert, das Perhydrol verkocht, zuletzt gekühlt und in 2 ml Wasser aufgenommen. Zur Hydrolyse des jetzt vorliegenden Pyro- und Polyphosphates wurde die Probe 10 min bei 100°C gehalten (Wasserbad), danach 1 Tropfen p-Nitrophenol als Indikator zugesetzt und mit 5 N KOH bis zum Farbumschlag titriert. 0.1 bis 2 ml dieser Lösung (0.1-1  $\mu M$  Phosphat) wurden mit Wasser auf das Volumen von 2 ml verdünnt, danach mit 0.5 ml Ammoniummolybdat-Lösung (2.5 % Ammoniummolybdat in 5 N  $H_2SO_4$ ) und 0.2 ml 1-Amino-2-naphthol-4-sulfonsäure-Lösung versetzt und mit Wasser auf 5 ml verdünnt. Genau 10 min nach Start der Reaktion wurde die OD bei 660 nm gemessen. Der gemessene Wert wurde mit einem Leerwert korrigiert und mit einer Eichkurve verglichen.

Aminonaphtholsulfonsäurelösung: 0.4 g 1-Amino-2-naphthol-4-sulfonsäure mit 1 g  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  in 10 ml Wasser lösen, 29 g  $\text{NaHSO}_3$  in 190 ml Wasser lösen, dann beide Lösungen vereinigen. Mischung filtrieren und bei  $0^\circ\text{C}$  in dunkler Flasche aufbewahren (166,167).

f) POISSON-Verteilung

Nach Bakteriophageninfektion hängt der Anteil einfach, zweifach, etc. und auch der von uninfizierten Bakterien von der zugegebenen durchschnittlichen Anzahl von Phagenpartikeln pro Zelle, d.h. von der  $m$ , ab. Der Anteil  $P_{(K)}$  der Zellen, die von  $K$  Viruspartikeln infiziert werden, wird durch die POISSON-Verteilung beschrieben.

POISSON-Verteilung:

$$P_{(K)} = \frac{e^{-m} \cdot m^K}{K !}$$

$m = m_0$ ;  $P_{(K)}$  = Anteil der Zellen, die von  $K$  Partikeln infiziert werden.

Für den Anteil uninfizierter Zellen  $P_{(0)}$  vereinfacht sich die Formel zu:

$$P_{(0)} = e^{-m}$$

oder  $m = -\ln P_{(0)}$

Aus dem Anteil überlebender Bakterien nach einem Infektionsversuch läßt sich mit der letzten Formel die  $m_0$  an killendem Agens berechnen. Bei Phageninfektion war die so berechnete  $m_0$  mit der aus der eingesetzten Phagenmenge berechneten  $m_0$  identisch. Bei Infektion mit Phagen-ghosts (aus osmotisch geschockten T4-Phagen) ergab die Berechnung des ghost-Titers aus dem Anteil überlebender Bakterien einen niedrigeren Wert (a) als die eingesetzte, aus dem ursprünglichen Phagentiter berechenbare  $m_0$  an ghost-Partikeln (b).

Das Zahlenverhältnis  $\frac{b}{a}$  gibt an, auf wieviele ghost-Partikel ein biologisch aktiver ghost kommt.

## 2. Präparative Methoden

### a) Phagentechniken

#### a) Gewinnung von Phagen-infizierten Bakterien

Alterationsbedingungen: Alterierte RNA-Polymerase wurde aus Zellen gewonnen, die 3 min vor T4-Infektion (moi 5-8) auf 100 µg/ml Chlorampenicol gebracht wurden. Die Bakterienernte erfolgte 5 min nach Infektion durch Einstellen auf 0.01 M  $\text{NaN}_3$ , Eiskühlung und Zentrifugation.

Modifikationsbedingungen: Bakterien, die 8 bis 10 min nach T4-Infektion (moi 5-8) wie oben beschrieben geerntet wurden, enthielten modifizierte RNA-Polymerase.

#### β) Herstellung von T4-Lysaten

Von den getesteten Methoden zur Präparation von Lysaten mit hohem Phagentiter haben sich vor allem die beiden im Folgenden geschilderten bewährt. Hierbei wurden die für den verwendeten T4-Stamm permissiven Wirtsbakterien in Medium A bei 37°C gezogen und wie angegeben infiziert:

- Bei  $5 \cdot 10^8$  E.coli/ml erfolgte T4-Infektion mit moi 5; nach 2 Stunden wurde vollständige Lyse durch Chloroformzusatz herbeigeführt.
- Bei  $6 \cdot 10^8$  E.coli/ml erfolgte T4-Infektion mit moi 0.1; 4-6 Stunden nach Infektion Lyse durch Chloroformzugabe.

#### γ) Herstellung von T4-Konzentraten

Bei einer Zelldichte von  $4 \cdot 10^8$ /ml (E.coli B bzw. CR63) in Medium A wurden sie mit T4-Phagen (Wildtyp bzw. T4am) infiziert (moi 0.1). Nach 3 Stunden erfolgte Bakterienernte durch Zentrifugation. Unter diesen Bedingungen kam es zu Lyseinhibition durch Mehrfachinfektion. Nach Resuspendierung der Bakterien in wenig Puffer und ihrer

Behandlung mit Chloroform und DNase wurden die Phagen frei und fanden sich nach Abzentrifugieren der Zelltrümmer im Überstand.

#### δ) Reinigung von T4-Phagen

T4-Lysate wurden durch Kieselgurfiltration von Zelltrümmern befreit, auf 0.5 M NaCl gebracht und die Phagen mit 8 % Polyäthylenglykol 6000 ausgefällt (168). Das abzentrifugierte (30 min, 11.200 g) Phagenpräzipitat wurde in Puffer gelöst und über einen Cäsiumchlorid-Stufengradienten (4 Dichtestufen: 1.73; 1.55; 1.46; 1.30 g/ml) durch Zentrifugation gereinigt (2 h, 87.500 g). Die phagenhaltige Fraktion wurde durch anschließende Gleichgewichtszentrifugation (24 h, 147.000 g) weiter gereinigt und konzentriert.

#### ε) Präparation von $\phi 80$ und $\lambda$ Phagen

$\phi 80$ psu<sub>III</sub><sup>+</sup> Phagen wurden auf E.coli BF266 wie beschrieben (169) vermehrt und aus den Lysaten gereinigt. Die Präparation der transduzierenden  $\lambda$  Phagen aus den lysogenen E.coli Stämmen erfolgte wie in der Literatur angegeben (54).

#### ζ) UV-Inaktivierung von Phagen

5 ml T4-Phagen wurden unter Schütteln in einer offenen Petrischale (Ø 8.2 cm) aus 25 cm Abstand mit einer UV-Lampe (Hanau NN 30/89) bestrahlt. Leistungsaufnahme des Brenners 35 W, Strahlungsfluß bei 254 nm: 15 W.

#### η) Präparation von Phagen-ghosts

Nach osmotischem Schocken wurden die ghost-Lösungen zur Stabilisierung auf die halbe Salzkonzentration von TA-Puffer gebracht.

##### 1) Nach Fabricant & Kennell (24)

0.1 ml Glycerin und 0.1 ml T4-Lösung 30 min bei 37°C inkubieren, dann 9.8 ml H<sub>2</sub>O schnell einblasen.

##### 2) Nach Herriott & Barlow (20)

0.15 ml T4-Lösung und 0.3 ml 3M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> für 2 min bei 37°C inkubieren, dann 7 ml H<sub>2</sub>O schnell zugeben.

- 3) Nach French & Siminovitch (22)  
0.2 ml gesättigte NaCl-Lösung und 0.1 ml T4-Lösung 15 min bei 25°C inkubieren; dann 9.7 ml H<sub>2</sub>O schnell einblasen.
- 4) Nach Duckworth (19)  
T4-Lösung auf 2M NaOAc, pH 8.0, bringen; 15 min bei 0°C inkubieren, dann 100-fach in kaltem, kräftig rührendem H<sub>2</sub>O verdünnen.
- 5) Nach Hofschneider (21)  
T4-Lösung in 8M Harnstoff verdünnen.
- 6) Nach Laemmli (23)  
Festes NaCl zugeben bis T4-Lösung 5 M; wiederholt in Aceton/Trockeneis einfrieren und auftauen, auf 0.02 M MgSO<sub>4</sub> bringen, DNase zugeben.

### 2) Präparation von Phagenbausteinen

Extraktherstellung: Hierzu wuchs E.coli B bei 37°C in Medium A (2 l) bis zu einer Zelldichte von  $6 \cdot 10^8$ /ml. Zum Zeitpunkt 0 und 8 min wurde mit je einer  $moi$  5 mit Phagen infiziert. Zum Zeitpunkt 45 min wurden die Bakterien auf Eis gegossen und durch Zentrifugation (1.500 g) geerntet. Die geernteten Bakterien wurden in Puffer (0.01 M Tris-Acetat, pH 7.4, 0.02 M MgSO<sub>4</sub>, 0.002 M Dithiothreitol, 0.1 mM EDTA, 40 µg DNase/ml) aufgenommen und durch Einfrieren in Aceton-Trockeneis und anschließendes Auftauen lysiert. Diese Extrakte wurden mit 3 verschiedenen Phagen-Mutanten hergestellt. Ausgefallene Gene und im Extrakt enthaltene Phagenteile sind in Klammern angegeben: T4 amB17, amN120 (23<sup>-</sup>, 27<sup>-</sup>; Schwanzfasern), T4 amH11 (23<sup>-</sup>; Schwanzfasern und Schwänze), T4 amN120 (27<sup>-</sup>; Schwanzfasern und Köpfe).

Verwendung: 13 l E.coli B in Medium A wurden bei einem Titer von  $6 \cdot 10^8$ /ml auf 100 µg/ml Chloramphenicol gebracht. Nach 3 min erfolgte die Zugabe von 13 ml Extrakt (das entsprach einer  $moi$   $\geq 10$  für Phagenbruchstücke). 5 min nach Extraktzugabe wurde NaN<sub>3</sub> bis zu einer Konzentration von 0.01 M zugesetzt, die Bakterien auf Eis gegossen und abzentrifugiert. Die Reinigung der RNA-Polymer erfolgte nach der Schnellmethode, ihre Analyse auf Alteration in der Cellogel-Elektrophorese.

b) Darstellung von DNA

Gereinigte T4-Phagen wurden gegen 0.01 M Tris-HCl, pH 7.3, 0.001 M EDTA dialysiert und die Konzentration von 1 mg Phagen/ml eingestellt ( $\hat{=}$  25 OD<sub>260</sub>). Die DNA wurde durch viermaliges Ausschütteln (15 min, 37°C) mit gleichem Volumen 90 %iger Phenollösung, die 0.08 % Oxychinolin enthielt, gewonnen. Zur Entfernung des restlichen Proteins wurde die wässrige Phase noch dreimal mit einer Chloroform-Octanol-Mischung (9:1) und zweimal mit reinem Chloroform extrahiert. Anschließend wurde die DNA-Lösung gegen 0.01 M Tris-HCl, pH 7.0, 0.001 M EDTA dialysiert.

Die Darstellung von  $\lambda$  und  $\phi 80$  DNA erfolgte wie bei Zubay (54) beschrieben.

c) Isolierung der RNA-Polymerase

a) Normalmethode

Die Isolierung der RNA-Polymerase erfolge nach der beschriebenen Methode (170) aber mit den folgenden Änderungen:

1 kg Bakterien wurden in 1.5 l TA-Puffer suspendiert, mit einer "Gaulin Press" bei 600 kg/cm<sup>2</sup> aufgeschlossen, und dann mit 350 ml Polymin P (1:5 verdünnt; gegen TA dialysiert) gefällt. Das Sediment wurde 4 Mal mit 0.6 M NH<sub>4</sub>Cl in TA-Puffer gewaschen und 4 Mal mit 1.2 M NH<sub>4</sub>Cl in TA-Puffer eluiert. Das Eluat wurde mit festem Ammonsulfat auf 55 % Sättigung gebracht. Das Ammonsulfatsediment wurde mit seinem eigenen Volumen an TA-Puffer, das restliche Sediment wurde nochmals mit 30 % Ammonsulfat gesättigtem TA eluiert.

Die vereinigten Eluate wurden in 400 g DEAE Cellulose (Feuchtgewicht) eingerührt. Diese wurde säulenchromatographisch mit TA-Puffer gewaschen und mit 700 ml eines Gradienten von 0.022 M bis 0.7 M NH<sub>4</sub>Cl in TA-Puffer eluiert. Die RNA-Polymerasehaltige Fraktion wurde mit Ammonsulfat fraktioniert gefällt. Die 40 % bis 50 % Fällungsfraction, die die RNA-Polymerase enthielt, wurde in TA-Puffer gelöst und gegen TA-Puffer dialysiert. Nach Zentrifugation (45 h, 151.000 g) in einem Rohrzuckergradienten (von 10 % Rohr-

zucker, 5 % Glycerin bis 30 % Rohrzucker, 10 % Glycerin; beide in TA-Puffer mit 0.5 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ), ist reine RNA-Polymerase als Hauptproteinfraktion isolierbar.

$\alpha$  Faktor wurde durch Phosphorylcellulose-Chromatographie gewonnen (171) und durch Rohrzucker-Glycerin-Gradientenzentrifugation weiter gereinigt.

#### $\beta$ ) Schnellmethode

Diese Methode ist zur schnellen Isolierung enzymatisch aktiver RNA-Polymerase aus kleinen Bakterienmengen geeignet.

20 g Bakterien wurden in 30 ml TA-Puffer suspendiert, mit einer Aminco Pressure Cell aufgeschlossen, nach Zugabe von 0.25 mg DNase auf 0.02 M  $\text{Mg}(\text{OAc})_2$  gebracht und bei  $0^\circ\text{C}$  30 min inkubiert. Nach Abzentrifugieren der Zelltrümmer (15 min, 48.000 g) wurde Protein mit 55 % Ammonsulfat gefällt und abzentrifugiert (15 min, 48.000 g). Dieses Präzipitat wurde in TA-Puffer gelöst und dann mit 1 ml Polymin P (1:5 verdünnt, gegen TA dialysiert) gefällt. Das Polymin P Sediment wurde 2 Mal mit 0.7 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$  in TA-Puffer gewaschen und 2 Mal mit 1.2 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$  in TA-Puffer eluiert. Die 40 - 50 % Ammonsulfatfraktion dieses Eluats ergab nach Reinigung über einen Sucrose-Gradienten (wie unter  $\alpha$ ) beschrieben) 6.2 mg reine RNA-Polymerase.

#### d) Zusammensetzung des zellfreien Proteinsynthesesystems

Kultur der Bakterien, deren Aufschluß und Herstellung des zellfreien Extrakts erfolgten wie bei Zubay (54) angegeben.

Die Präinkubationsmischung zur Präparation 100 ml zellfreien Extrakts enthielt 4.62 ml 2 M Tris-Acetat, pH 8.2; 0.18 ml 0.5 M Dithiothreitol; 0.258 ml 1 M  $\text{Mg}(\text{OAc})_2$ ; 0.18 ml 5 mM Aminosäure-Mix (L-Formen, alle 20 bis auf Tyr); 0.055 ml 16.5 mM Tyrosin in 0.125 M HCl; 0.74 ml 0.1 M ATP in 0.01 M Tris-Acetat, pH 8.2; 4.15 ml 0.24 M Phosphoenolpyruvat, Na-Salz in  $\text{H}_2\text{O}$ ; 0.092 ml Pyruvatkinase (10 mg/ml).

Ein Proteinsyntheseansatz von 0.5 ml enthielt 0.125 ml Synthesemix, 0.173 ml Wasser, 0.025 ml 0.01 M cAMP, 0.032 ml Ca-Mg-Acetat (0.184 M  $\text{Mg}(\text{OAc})_2$ ; 0.092 M  $\text{Ca}(\text{OAc})_2$ ), 0.04 ml Polyäthylenglykol 6000 (0.266 g/ml  $\text{H}_2\text{O}$ ), 0.025 ml  $\lambda$  plac 5 DNA (0.5 mg/ml). Nach 3 min Vorinkubation bei 37°C erfolgte der Synthesestart durch Zugabe von 0.07 ml zellfreien Extrakts. Falls Rifampicin zugegeben wurde, dann in einer Konzentration von 1  $\mu\text{g}/0.5$  ml Syntheseansatz.

Der Synthesemix wurde durch Mischung folgender Lösungen hergestellt: 2 ml 2 M Tris-Acetat, pH 8.2, 0.25 ml 0.5 M Dithiothreitol, 1 ml 5 M Kaliumacetat, 0.5 ml 5 M Ammoniumacetat, 4 ml 5 mM Aminosäure-Mix (L-Formen, alle 20 bis auf Tyr), 1.2 ml 16.5 mM Tyrosin in 0.125 M HCl, 2 ml Triphosphat-Mix (0.1 M ATP; je 0.025 M GTP, UTP, CTP; Na-Salze), 10.55 ml 0.182 M Phosphoenolpyruvat (Na-Salz), 1 ml t-RNA (10 mg/ml), 2.5 ml Cofaktor-Mix (Pyridoxin-HCl,  $\text{NADP}^+$ , FAD, p-Aminobenzoesäure, Folsäure, je 1 mg/ml in 0.01 M Tris-Acetat, pH 8.2, gelöst).

Der  $\beta$ -Galaktosidasetest erfolgte nach 1 h Synthesezeit durch Mischen von 0.2 ml resuspendiertem Syntheseansatz mit 1.5 ml o-Nitrophenyl- $\beta$ -Galaktosidlösung. Nach einer 1:1 Verdünnung sind die für einen einstündigen  $\beta$ -Galaktosidasetest berechneten  $\text{OD}_{420}$ -Werte angegeben. Alle anderen Bedingungen wie bei Zubay (54) beschrieben.

#### D. ZUSAMMENFASSUNG

Die RNA-Polymerase in E.coli wird während der Infektion mit dem Bakteriophagen T4 in zwei aufeinanderfolgenden Schritten verändert: Alteration und Modifikation.

Die Alteration erfolgt sofort nach Infektion, auch bei gehemmter Proteinsynthese. Die Modifikation läuft langsamer und nur in Gegenwart von Proteinsynthese ab.

- 1) Alterierte und modifizierte  $\alpha$ -Untereinheiten enthalten je 2 Phosphate und 1 Adenin pro Peptidkette. Aus ( $^{32}\text{P}$ )-Phosphat markiertem modifiziertem  $\alpha$  läßt sich mit Schlangengift Phosphodiesterase mit pyrophosphorolytischer Aktivität die Hälfte der Radioaktivität als 5'-AMP abspalten. Die restliche noch am Protein verbleibende Markierung wird dann für Phosphomonoesterase zugänglich. Aus allen analytischen Daten ergibt sich eine Identität von alteriertem und modifiziertem  $\alpha$ .
- 2) Aus osmotisch geschockten  $\text{T4}^+$ -Phagen läßt sich eine  $\text{NAD}^{\oplus}$ : Protein ADP-Ribosyltransferase isolieren. Durch Heranziehung einer alterationslosen Phagenmutante ( $\text{T4 alt}^-$ ) läßt sich beweisen, daß diese Enzymaktivität die Ursache der schnellen, Proteinsynthese-unabhängigen Alteration der RNA-Polymerase ist. Die Alterationstransferase ist, zusätzlich zu den drei bisher schon bekannten, ein neues, ebenfalls nicht essentielles internes Phagenprotein, welches bei der Infektion in den Wirt injiziert wird. Trotz unterschiedlicher Entstehungsweise sind alteriertes und modifiziertes  $\alpha$  chemisch identisch ADP-ribosyliert. Daher wird für Alteration und Modifikation eine Reaktionsgleichung der ADP-Ribosylierung vorgeschlagen.
- 3) Phagenbruchstücke, Phagen-ghosts oder UV-bestrahlte Phagen enthalten die Alterationstransferase entweder überhaupt nicht oder können sie nicht in den Wirt injizieren.

- 4) Da die Modifikation von der Expression eines T4-Gens nach Infektion abhängig ist, wird sie durch Rifampicin verhindert. Hierdurch wird der Phosphateinbau in die  $\alpha$ -Untereinheiten um die Hälfte, d.h. auf Alterationsniveau gesenkt.
- 5) Eine neue Methode wurde entwickelt, um die Transkriptionsspezifität verschiedener RNA-Polymerasen zu vergleichen. Sie beruht auf der Hemmung endogener RNA-Polymerase eines Proteinsynthesystems, in dem Transkription und Translation gekoppelt sind, durch Rifampicin und deren Ersatz durch Zugabe verschiedener Rifampicin resistenter RNA-Polymerasen.
- 6) T4-induzierte ADP-Ribosylierung der RNA-Polymerase stellt eine starke negative Kontrolle der E.coli Genexpression dar. Rekonstitutionsversuche beweisen, daß sie auf den veränderten RNA-Polymerase  $\alpha$ -Untereinheiten beruht. Die kovalente Bindung chemischer Gruppen an die RNA-Polymerase stellt ein neues Prinzip der Regulation der Genexpression dar.
- 7) Normale und modifizierte RNA-Polymerase führen im zellfreien Proteinsynthesystem zur Expression derselben T4-Gene. Aber nur modifizierte RNA-Polymerase führt zusammen mit einer Proteinfraction aus T4-infizierten Zellen zur in vitro Synthese "nicht früher" T4-Proteine.
- 8) Die beobachtete starke Hemmung der E.coli Genexpression in vitro durch T4-DNA und die ADP-Ribosylierung der RNA-Polymerase stehen möglicherweise im Zusammenhang mit der Abschaltung der Wirtstranskription nach Phageninfektion.

# LITERATURVERZEICHNIS

Abkürzungen von Zeitschriftentiteln, die nicht offiziell verwendet werden:

|        |                                                      |
|--------|------------------------------------------------------|
| BBRC   | Biochem. Biophys. Res. Commun.                       |
| CSHSQB | Cold Spring Harbor Symposion of Quantitative Biology |
| JBC    | Journal of Biological Chemistry                      |
| JMB    | Journal of Molecular Biology                         |
| MGG    | Mol. Gen. Genet.                                     |
| PNAS   | Proc. Nat. Acad. of Sciences USA                     |

1. Walter, G., Seifert, W. & Zillig, W., BBRC 30, 240 (1968)
2. Seifert, W., Qasba, P., Walter, G., Palm, P., Schachner, M. & Zillig, W., Eur. J. Biochem. 9, 319 (1969)
3. Goff, C.G. & Weber, K., CSHSQB 35, 101 (1970)
4. Goff, C.G., JBC 249, 6181 (1974)
5. Horvitz, H., JMB 90, 727 (1974)
6. Schäfer, R., Mailhammer, R., Rabussay, D., Seifert, W., Sethi, V.S. & Zillig, W., Hoppe Seyler's Z. Phys. Chem. 352, 1398 (1971)
7. Heil, A. & Zillig, W., FEBS Lett. 11, 165 (1970)
8. Rahmsdorf, H.J., Pai, S.H., Ponta, H., Herrlich, P., Roskoski, J., Schweiger, M. & Studier, F.W., PNAS 71, 586 (1974)
9. Zillig, W., Proc. Meet. Fed. Eur. Biochem. Soc. Budapest, pp. 239-251 (1974)
10. Zillig, W., Fujiki, H., Blum, W., Janeković, D., Schweiger, M., Rahmsdorf, H.J., Ponta, H. & Hirsch-Kauffmann, M., PNAS 72, 2506 (1975)
11. Zillig, W., persönliche Mitteilung
12. Seifert, W., Rabussay, D. & Zillig, W., FEBS Lett. 16, 175 (1971)
13. Rabussay, D., Mailhammer, R. & Zillig, W., in: "Metabolic Interconversions of Enzymes", eds. O. Wieland, E. Helmreich, H. Holzner, p. 213, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York (1972)
14. Rohrer, H., Zillig, W. & Mailhammer, R., Eur. J. Biochem. 60, 227 (1975)
15. Proceedings of the Seminar on Poly(ADP-ribose) and ADP-ribosylation of Protein (1975). J. Biochem. 77, 1-11 (1975)

16. Hasegawa, S., Fujimura, S., Shimizu, Y. & Sugimura, T., BBA 149, 369 (1967)
17. Wood, W.B., Edgar, R.S., King, J., Lielausis, A. & Henninger, M., Fed. Proc. 27, 1160 (1968)
18. King, J., JMB 58, 693 (1971)
19. Duckworth, D.H., Virology 40, 673 (1970)
20. Herriott, R.M. & Barlow, J.L., J. Gen. Physiology 40, 809 (1956)
21. Hofschneider, P.H., Nature 186, 330 (1960)
22. French, R.C., Siminovitch, L., Can. J. Microbiol. 1, 757 (1955)
23. Laemmli, U.K., Nature 227, 680 (1970)
24. Fabricant, R. & Kennell, D., Journal of Virology 6, 772 (1970)
25. Duckworth, D.H., Bacteriol. Reviews 34, 344 (1970)
26. Kellenberger, E., persönliche Mitteilung
27. Delius, H., persönliche Mitteilung
28. Minagawa, T., Virology 13, 515 (1961)
29. Black, L.W. & Ahmad-Zadeh, C., JMB 57, 71 (1971)
30. Showe, M.K. & Black, L.W., Nature New Biol. 242, 70 (1973)
31. Goff, C.G., persönliche Mitteilung
32. Horvitz, H., JMB 90, 739 (1974)
33. Skórko, R., persönliche Mitteilung
34. Goff, C.G., in: "Metabolic Interconversion of Enzymes" eds. Fischer, E.H., Krebs, E.G., Neurath, H., Stadtman, E.R., pp. 235-244, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York (1974)
35. Rabussay, D. & Geiduschek, E.P., "Regulation of Gene Action in the Development of Lytic Bacteriophages" in: "Comprehensive Virology" (1976)
36. Zatman, L.J., Kaplan, N.O. & Colowick, S.P., JBC 200, 197 (1953)
37. Collier, R.J., Bacteriol. Reviews 39, 54 (1975)
38. Edson, C., Ueda, K. & Hayaishi, O., J. Biochem. 77, 9 (1975)
39. Robinson, E.A., Henrikson, O. & Maxwell, E.S., JBC 249, 5088 (1974)
40. Kun, E., Zimmer, P.H., Chang, A.C.Y., Puschendorf, B. & Grunicke, H., PNAS 72, 1436 (1975)
41. Sugimura, T., Progr. in Nucl. Ac. Res. and Molec. Biol. 13, 127 (1973)

42. Honjo, T. & Hayaishi, O., Current Topics in Cellul. Regul. 7, 87 (1973), Academic Press, New York and London
43. Honjo, T., Ueda, K., Tanabe, T. & Hayaishi, O., in: "Metabolic Interconversion of Enzymes", eds. Wieland, O., Helmreich, E., Holzer, H., p. 193, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York (1972)
44. Gumpert, R.J. & Lehmann, J.R., PNAS 68, 2559 (1971)
45. Kittredge, J.S., Roberts, E. & Simonsen, D.G., Biochemistry 1, 624 (1962)
46. Holzer, H. & Duntze, W., Ann. Rev. Biochem. 40, 345 (1971)
47. Stadtman, E.R. & Ginsburg, A., The Enzymes, Vol. X, 3rd ed., p. 755 (1974)
48. Iglewski, B.H. & Kabat, D., PNAS 72, 2284 (1975)
49. Burzio, L. & Koide, S.S., BBRC 40, 1013 (1970)
50. Roberts, J.H., Stark, P. & Smulson, M., PNAS 71, 3212 (1974)
51. Kidwell, W.R., J. Biochem. 77, 6 (1975)
52. Yoshihara, K., Tanigawa, Y., Burzio, L. & Koide, S.S., PNAS 72, 289 (1975)
53. Claycomb, W.C., FEBS Lett. 61, 231 (1976)
54. Zubay, G., Ann. Rev. Genet. 7, 267 (1973)
55. Boyd, D.H., Zillig, W. & Scaife, F.J.G., MGG 130, 315 (1974)
56. Bautz, E.K.F. & Dunn, J.J., BBRC 34, 230 (1969)
57. Travers, A., CSHSQB 35, 241 (1970)
58. Khesin, R., Bogdanova, E., Goldfarb, A. & Zograff, J., MGG 119, 299 (1972)
59. Stevens, A., PNAS 69, 603 (1972)
60. Stevens, A., Biochemistry 13, 493 (1974)
61. De Crombrughe, B., Sankar, A., Gottesman, M. & Pastan, I., Nature New Biol. 241, 260 (1973)
62. Kleppe, R.K., FEBS Lett. 51, 237 (1975)
63. Stevens, A. & Rhoton, J.C., Biochemistry 14, 5074 (1975)
64. Richardson, J.P., CSHSQB 35, 127 (1970)
65. Goldberg, A., CSHSQB 35, 157 (1970)
66. Millette, R.L., Trotter, C.D., Herrlich, P. & Schweiger, M., CSHSQB 35, 135 (1970)
67. Schäfer, R. & Zillig, W., Eur. J. Biochem. 33, 215 (1973)
68. Seifert, W., "RNA Polymerase and Transcription", in: Proc. of the 1st Int. Lepetit Colloquium, L. Silvestri, ed., p. 158, North Holland Publishing Company, Amsterdam, London (1969)

69. Schachner, M. & Seifert, W., Hoppe Seyler's Z. Phys. Chemie 352, 734 (1971)
70. Schachner, M., Seifert, W. & Zillig, W., Eur. J. Biochem. 22, 520 (1971)
71. Hager, G., Hall, B.D. & Fields, K., CSHSQB 35, 233 (1970)
72. O'Farrell, P.Z. & Gold, L.M., JBC 248, 5512 (1973)
73. Shine, J. & Dalgarno, L., Nature 254, 34 (1975)
74. Steitz, J.A. & Jakes, K., PNAS 72, 4734 (1975)
75. Morse, D.E. & Yanofsky, C., Nature 224, 329 (1969)
76. Hiraga, S. & Yanofsky, C., JMB 72, 103 (1972)
77. Ilyina, T.S., Ovadis, M.I., Mindlin, S.Z., Gorlenko, Zh.M. & Khesin, R.B., MGG 110, 118 (1971)
78. Manley, J., Reiness, G., Zubay, G. & Gefter, M., Arch. Biochem. Biophys. 157, 50 (1973)
79. Zubay, G., Cheong, L. & Gefter, M., PNAS 68, 2195 (1971)
80. Schachner, M. & Zillig, W., Eur. J. Biochem. 22, 513 (1971)
81. Palm, P., Heil, A., Boyd, D., Grampp, B. & Zillig, W., Eur. J. Biochem. 53, 283 (1975)
82. Travers, A., Nature 225, 1009 (1970)
83. Krakow, J.S. & von der Helm, K., CSHSQB 35, 73 (1970)
84. Wu, C.-W., Yarbrough, L., Hillel, Z. & Wu, F., PNAS 72, 3019 (1975)
85. Chamberlin, M.J., Ann. Rev. Biochem. 43, 721 (1974)
86. Saucier, J.M. & Wang, J.C., Nature New Biol. 239, 167 (1972)
87. Pribnow, D., JMB 99, 419 (1975)
88. Travers, A., Cell 3, 97 (1974)
89. Zillig, W., Zechel, K., Rabussay, D., Schachner, M., Sethi, V.S., Palm, P., Heil, A. & Seifert, W., CSHSQB 35, 47 (1970)
90. Mangel, W. & Chamberlin, M.J., JBC 249, 3002 (1974)
91. Domingo, E., Escarmis, C. & Warner, R., JBC 250, 2866 (1975)
92. Domingo, E., Escarmis, C. & Warner, R., JBC 250, 2872 (1975)
93. Walter, G., Zillig, W., Palm, P. & Fuchs, E., Eur. J. Biochem. 3, 194 (1967)
94. Mangel, W. & Chamberlin, M., JBC 249, 3007 (1974)
95. Kung, H., Brot, N., Spears, C., Chen, B. & Weissbach, H., Arch. Biochem. Biophys. 160, 168 (1974)
96. Nakanishi, S., Adhya, S., Gottesman, M. & Pastan, I., JBC 250, 8202 (1975)

97. von Hippel, P. & McGhee, J., Ann. Rev. Biochem. 41, 231 (1972)
98. Hayashi, Y. & Hayashi, M., Biochemistry 10, 4212 (1971)
99. Wang, J.C., Barkley, M.D. & Bourgeois, S., Nature 251, 247 (1974)
100. Zimmer, S.G. & Millette, R.L., Biochemistry 14, 300 (1975)
101. Remold-O'Donnel, E. & Zillig, W., Eur. J. Biochem. 7, 318 (1969)
102. Pène, J. & Barrow-Carraway, J., J. Bacteriol. 111, 15 (1972)
103. Travers, A., Nature 244, 15 (1973)
104. Richardson, J., 1973, zitiert von Chamberlin, M.J. in: Ann. Rev. Biochem. 43, 721 (1974)
105. Nomura, M., Witten, C., Mantei, N. & Echols, H., JMB 17, 273 (1966)
106. Kaempfer, R. & Magasanik, B., JMB 27, 453 (1967)
107. Kaempfer, R. & Magasanik, B., JMB 27, 475 (1967)
108. Oleson, A., Pispa, J. & Buchanan, J., PNAS 63, 473 (1969)
109. Rouvière, J., Wyngaarden, J., Cantoni, J., Gros, F. & Kepes, A., BBA 166, 94 (1968)
110. Kennell, D., J. of Virology 2, 1262 (1968)
111. Hayward, W. & Green, M., PNAS 54, 1675 (1965)
112. Landy, A. & Spiegelman, S., Biochemistry 7, 585 (1968)
113. Adesnik, M. & Levinthal, C., JMB 48, 187 (1970)
114. Volkin, E., PNAS 46, 1336 (1960)
115. Cohen, S.S., Sekiguchi, M., Stern, J.L. & Barner, H.D., PNAS 49, 699 (1963)
116. Nomura, M., Okamoto, K. & Asano, K., JMB 4, 376 (1962)
117. Haselkorn, R., Vogel, M. & Brown, R.D., Nature 221, 836 (1969)
118. Mizuno, S. & Nitta, K., BBRC 35, 127 (1969)
119. Guha, A., Szybalski, W., Salser, W., Bolle, A., Geiduschek, E.P. & Pulitzer, J.F., JMB 59, 329 (1971)
120. Notani, G.W., JMB 73, 231 (1973)
121. Salser, W., Bolle, A. & Epstein, R., JMB 49, 271 (1970)
122. Milanesi, G., Brody, E.N., Grau, O. & Geiduschek, E.P., PNAS 66, 181 (1970)
123. Brody, E., Sederoff, R., Bolle, A. & Epstein, R.H., CSHSQB 35, 203 (1970)
124. O'Farrell, P.Z. & Gold, L.M., JBC 248, 5502 (1973)

125. Gold, L.M., O'Farrell, P.Z., Singer, B. & Stormo, G. in: "Virus Research", eds. Fox, C.F. and Robinson, W.S., p. 205, Academic Press, New York and London (1973)
126. Cohen, P.S., Natale, P.J. & Buchanan, J.M., J. Virol. 14, 292 (1974)
127. Hercules, K. & Sauerbier, W., J. Virol. 14, 341 (1974)
128. Matson, T., Richardson, J. & Goodin, D., Nature 250, 48 (1974)
129. Morse, D.E., CSHSQB 35, 495 (1970)
130. Morse, D.E., JMB 55, 113 (1971)
131. Hansen, M.T., Bennett, P.M. & von Meyenburg, K., JMB 77, 589 (1973)
132. Cremer, K., Imamoto, F. & Schlessinger, D., MGG 130, 183 (1974)
133. Bautz, E.K.F., Bautz, F. & Dunn, J.J., Nature 223, 1022 (1969)
134. Franklin, N.C., JMB 89, 33 (1974)
135. Adhya, S., Gottesman, M. & de Crombrughe, B., PNAS 71, 2534 (1974)
136. Segawa, T. & Imamoto, F., JMB 87, 741 (1974)
137. Daegelen, P., d'Aubenton, Y. & Brody, E., Abstracts 10th Int. Congress FEBS, Paris 1975, Abstr. No. 368
138. Black, L.W. & Gold, L.M., JMB 60, 365 (1971)
139. Geiduschek, E.P. & Grau, O., "RNA Polymerase and Transcription" in: Proceedings of the 1st Int. Lepetit Colloquium, L. Silvestri ed., pp. 190-203, North Holland Publishing Company, Amsterdam, London (1970)
140. Epstein, R.H., Bolle, A., Steinberg, C.M., Kellenberger, E., Boy de la Tour, E., Edgar, R.S., Susman, M., Denhardt, G.H. & Lielausis, A., CSHSQB 28, 375 (1963)
141. Bolle, A., Epstein, R.H., Salser, W. & Geiduschek, E.P., JMB 31, 325 (1968)
142. Pulitzer, J.F., JMB 49, 473 (1970)
143. Pulitzer, J.F. & Geiduschek, E.P., JMB 49, 489 (1970)
144. Stevens, A., BBRC 41, 367 (1970)
145. Horvitz, H., Nature New Biol. 244, 137 (1973)
146. Ratner, D., JMB 89, 803 (1974)
147. Ratner, D., JMB 88, 373 (1974)
148. Snyder, L.R. & Montgomery, D.L., Virology 62, 184 (1974)

149. Coppo, A., Manzi, A., Pulitzer, J.F. & Takahashi, H., JMB 96, 579 (1975)
150. Coppo, A., Manzi, A., Pulitzer, J.F. & Takahashi, H., JMB 96, 601 (1975)
151. Hemphill, H.E. & Whiteley, H.R., Bacteriological Reviews 39, 257 (1975)
152. Mailhammer, R., Yang, H.-L., Reiness, G. & Zubay, G., PNAS 72, 4928 (1975)
153. Wood, W.B., "Genetic map of bacteriophage T4", in: Handbook of Genetics, ed. R.C. King. Van Nostrand-Reinhold Co., New York (1974)
154. Kozloff, K.M., in: Molecular Basis of Virology, ed. Fraenkel-Conrat, p. 436. Reinhold Book Co., New York (1968)
155. Homyk, T. & Weil, T., Virology 61, 505 (1974)
156. Black, L.W., Virology 60, 166 (1974)
157. Black, L.W. & Abremski, K., Virology 60, 180 (1974)
158. Paddock, G. & Abelson, J., Nature New Biology 246, 2 (1973)
159. Wilson, J.H., Kim, J.S. & Abelson, J.B., JMB 71, 547 (1972)
160. Wilson, J.H., JMB 74, 753 (1973)
161. Guthrie, C. & McClain, W.H., JMB 81, 137 (1973)
162. Fraser, D. & Jerrel, E.A., JBC 205, 291 (1953)
163. Peschke, W., J. Chromatogr. 20, 572 (1965)
164. Mirault, M.E. & Scherrer, K., Eur. J. Biochem. 23, 372 (1971)
165. McClain, W.H., Guthrie, C. & Barrell, B.B., PNAS 69, 3703 (1972)
166. Fiske, C.H. & Subbarow, Y., JBC 66, 375 (1925)
167. Flynn, R.A., Jones, M.E. & Lipman, F. JBC 211, 791 (1954)
168. Yamamoto, K.R., Alberts, B.M., Benzinger, R., Lawhorne, L. & Treiber, G., Virology 40, 734 (1970)
169. Raab, C. & Gross, H.J., Eur. J. Biochem. 46, 507 (1974)
170. Zillig, W., Zechel, K. & Halbwachs, H.-J., Hoppe-Seyler's Z. Phys. Chem. 351, 221 (1970)
171. Burgess, R.R., JBC 244, 6168 (1969)
172. Wu, R. & Geiduschek, P., JMB 96, 513 (1975)
173. Wu, R., Geiduschek, P. & Cascino, A., JMB 96, 539 (1975)

## Lebenslauf

Name: Reinhard Mailhammer

Geburtsdatum: 8. April 1945

Geburtsort: Bad Wiessee

### Schulen:

|             |                                     |
|-------------|-------------------------------------|
| 1951 - 1955 | Volksschule in Moosburg und München |
| 1955 - 1958 | Frühlings Realgymnasium in München  |
| 1958 - 1965 | Gisela Realgymnasium in München     |
| 1965        | Abitur                              |

### akademische Ausbildung:

|             |                                                               |
|-------------|---------------------------------------------------------------|
| 1965 - 1970 | Biologiestudium an der Ludwig-Maximilians-Universität München |
|-------------|---------------------------------------------------------------|

|          |                       |
|----------|-----------------------|
| Mai 1968 | Vordiplom in Biologie |
|----------|-----------------------|

|               |                                          |
|---------------|------------------------------------------|
| Dezember 1970 | mündliche Hauptdiplomprüfung in Biologie |
|---------------|------------------------------------------|

|                               |                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|-------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Dezember 1970 -<br>April 1976 | Anfertigung einer Dissertation mit dem Thema "Strukturelle Modifikationen der DNA-abhängigen RNA-Polymerase in E.coli nach Infektion mit dem Bakteriophagen T4" unter Anleitung von Professor Dr. W. Zillig am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried bei München |
|-------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|









Dissertationsdruck  
GmbH & Co. KG.

*Schadel & Wehle*

8 München 40 Amalienstr. 81 Telefon 089/288 784/2. Etage